

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MİDE VE KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA p16,
MDM2 GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

GÜLAY TUNA

**DANIŞMAN
PROF.DR.İLHAN YAYLIM ERALTAN**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Gülay Tuna tarafından hazırlanan MİDE VE KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA p16, MDM2 GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

13 / Haziran / 2011

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

1.PROF.DR.İLHAN YAYLIM ERALTAN, İ.Ü DETAE Moleküler Tıp AD

2.DOÇ.DR.ARZU ERGEN, İ.Ü DETAE Moleküler Tıp AD

3.DOÇ.DR.HÜLYA YILMAZ AYDOĞAN, İ.Ü DETAE Moleküler Tıp AD

4.DOÇ.DR.EBRU EMEKLİ ALTURFAN, Marmara Ün. Diş Hek. Fak. Biyokimya AD

5.DOÇ.DR.ÜMİT ZEYBEK, İ.Ü DETAE Moleküler Tıp AD

İmza

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Gülay Tuna

İTHAF

Bu tezi, sevgisini ve yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen annem Beril Tuna, babam İmdat Tuna, kardeşim Mehmet Ali Tuna ve biricik dostum Atalay Çetinkaya'ya ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı kurucusu, emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Turgay İsbir'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen ve benden desteğini, iyi niyetini hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım Eraltan ve tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve çalışanlarına,

Tezim için gerekli hastaların seçimi, örneklerin sağlanması ile klinik değerlendirmelerindeki destek ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Soykan Arıkan ve Doç. Dr. Esra Kaytan Sağlam'a,

Tezimin yapımı ve yazımı sırasındaki yardımları ve destekleri için çok değerli arkadaşlarım, Özge Öztop, Neslihan Tokmak, Leman Melis Yurdum, Nihal Yiğitbaşı, Şeyma Sözen ve Atalay Çetinkaya'ya,

Attığım her adımda bana destek ve yardımcı olan, varlıklarıyla hayatıma en değerli anlamları katan, beni hep mutlu eden canım annem, canım babam, kardeşim olmak üzere tüm aileme yürekten teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:4489

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ VE KANSER	3
2.2. MİDE KANSERİ	7
2.2.1. MİDE KANSERİ RİSK FAKTÖRLERİ	8
2.2.1.1. Helicobacter Pylori :	8
2.2.1.2. Mide Lenfoması:	9
2.2.1.3. Cinsiyet:	9
2.2.1.4. Irk:	9
2.2.1.5. Coğrafya:	9
2.2.1.6. Diyet:	10
2.2.1.7. Sigara:	10
2.2.1.8. Obezite:	10
2.2.1.9. Daha Önceden Geçirilen Mide Ameliyatı	10
2.2.1.10. Pernisiyöz Anemi:	10
2.2.1.11. Menetrier Hastalığı (Hipertrofik Gastropati):	11
2.2.1.12. A Kan Grubu:	11
2.2.1.13. Ailede Mide Kanseri Hikayesi	11
2.2.1.14. Bazı Mide Polip Türleri	11
2.2.1.15. Epstein-Barr Virüs Enfeksiyonu	11

2.2.1.16. Sosyo-ekonomik durum:	11
2.2.1.17. Meslek:	12
2.2.1.18. Kalıtsal Kanser Sendromları:	12
2.2.1.19. Yaş :	12
2.2.2. MİDE KANSERİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI	13
2.3. KOLOREKTAL KANSER.....	15
2.3.1. KOLOREKTAL KANSER RİSK FAKTÖRLERİ.....	16
2.3.1.1. Yaş:	16
2.3.1.2. Önceden Geçirilmiş Polips veya Kolorektal Kanser Öyküsü:	17
2.3.1.3. Bir Bağırsak Hastalığı Öyküsüne Sahip Olmak:.....	17
2.3.1.4. Ailede Kolorektal Kanser Öyküsü:	17
2.3.1.5. Belirli Aile Sendromları:.....	17
2.3.1.6. Irk ve Etnik Köken:	18
2.3.1.7. Diyet:.....	18
2.3.1.8. Hareketsizlik:	18
2.3.1.9. Obezite:	18
2.3.1.10. Sigara:	18
2.3.2. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI	19
2.4. P16 (CDKN2A, MTS-I, INK4a).....	21
2.5. MDM2 (MURINE DOUBLE MINUTES)	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI	25
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	25
3.3. KULLANILAN GEREÇLER.....	26
3.4. ÇÖZELTİLER	26
3.4.1. DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER	26
3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer).....	26
3.4.1.2. 0.5 M Disodyumetilendiamintetraasetat (EDTA) (pH 8.0).....	26
3.4.1.3. 4 M Sodyum Klorür (NaCl)	26
3.4.1.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL).....	26
3.4.1.5. 1 M Tris Tamponu (Stok)	27
3.4.1.6. 9.5 M Amonyum Asetat.....	27
3.4.1.7. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS).....	27

3.4.1.8. Proteinaz K (20 mg/ml).....	27
3.4.2. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER.....	27
3.4.2.1. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X).....	27
3.4.2.2. Etidyum Bromür (10 mg/ml)	27
3.4.2.3. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE).....	27
3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	28
3.5.1. PERİFERİK KANDAN DNA İZOLASYONU.....	28
3.5.1.1. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini	28
3.5.2. p16 GEN POLİMORFİZMLERİNİN TESPİT EDİLMESİ.....	29
3.5.2.1. p16 540C→G ve 580C→T Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri.....	29
3.5.3. MDM2 GEN POLİMORFİZMLERİNİN TESPİT EDİLMESİ.....	29
3.5.3.1. MDM2 SNP309 (T>G) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri.....	29
3.5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PZR)'da Kullanılan Kimyasal Maddeler ve PZR'ın Hazırlanışı.....	29
3.5.4.1. PZR Karışımının Hazırlanışı.....	30
3.5.5. PZR Şartları.....	31
3.5.6. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE GEREÇLER	31
3.5.6.1. PZR Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklmesi:	32
3.5.6.2. PZR Ürünlerinin Kontrolü:	32
3.5.7. p16 GEN POLİMORFİZMLERİNDE ENZİM KESİMİ	33
3.5.7.1. p16 (540C→G) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler	33
3.5.7.2. p16 (580C→T) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler	33
3.5.7.3. MDM2 SNP309 (T>G) Gen Polimorfizmi Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler	34
3.5.8. p16 540C→G, 580C→T ve MDM2 SNP309 (T>G) Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü.....	35
3.5.8.1. p16 540C→G Gen Polimorfizminin Değerlendirilmesi	35
3.5.8.2. p16 580C→T Gen Polimorfizminin Değerlendirilmesi.....	36
3.5.8.3. MDM2 SNP309 (T>G) Gen Polimorfizminin Değerlendirilmesi	36

4. BULGULAR.....	38
4.1. PZR ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR	38
4.1.1. p16 540C→G ve 580C→T PZR Ürünlerine Ait Bulgular.....	38
4.1.2. MDM2 SNP309 (T>G) PZR Ürünlerine Ait Bulgular	38
4.2. KESİM ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR	39
4.2.1. p16 540C→G ve 580C→T Kesim Ürünlerine Ait Bulgular.....	39
4.2.2. MDM2 SNP309 (T>G) Kesim Ürünlerine Ait Bulgular	40
Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Hesaplar	41
4.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONRASINDA ELDE EDİLEN BULGULAR.....	41
KONTROL	42
5. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	67
HAM VERİLER	85
FORMLAR	86
ETİK KURUL KARARI	87
PATENT HAKKI İZNİ	88
TELİF HAKKI İZNİ.....	89
ÖZGEÇMİŞ	90

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1 : PZR karışımının hazırlanması	30
Tablo 2 : p16, 540C→G ve 580 C→T Gen Polimorfizmleri PZR Koşulları	31
Tablo 3 : MDM2, SNP309 (G>T) Gen Polimorfizmi PZR Koşulları	31
Tablo 4 : p16 (540C→G) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler.....	33
Tablo 5 : p16 (580C→T) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler.....	34
Tablo 6 : MDM2 SNP309 (T>G) Gen Polimorfizmi Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler.....	34
Tablo 7 : Çalışma gruplarına ait veriler	42
Tablo 8 : Mide kanserli hastalarda p16 540C→G ve 580C→T gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel dağılımları	43
Tablo 9 : Kolorektal kanserli hastalarda p16 540C→G ve 580C→T gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel dağılımları	46
Tablo 10 : Mide kanserli hastalarda MDM2 SNP309 (T>G) gen polimorfizmine ait genotip ve allel dağılımları	48
Tablo 11 : Kolorektal kanserli hastalarda MDM2 SNP309 (T>G) gen polimorfizmine ait genotip ve allel dağılımları	49
Tablo 12 : Kolorektal ve mide kanserli hastalarda p16 (540C→G, 580 C→T) kombine genotip analiz sonuçları	49
Tablo 13 : Kolorektal ve mide kanserli hastalarda MDM2 (SNP309), p16 (540C→G) kombine genotip analiz sonuçları	50
Tablo 14 : Kolorektal ve mide kanserli hastalarda MDM2 (SNP309), p16 (580C→T) kombine genotip analiz sonuçları	51
Tablo 15 : Kolorektal Kanserli Hastalarda p16 540C→G Allel Dağılımları ile Hastaların Klinik, Prognostik Parametrelerinin Değerlendirilmesi	52
Tablo 16 : Kolorektal Kanserli Hastalarda p16 580C→T Allel Dağılımları ile Hastaların Klinik, Prognostik Parametrelerinin Değerlendirilmesi	54
Tablo 17 : Kolorektal Kanserli Hastalarda MDM2 (SNP309 T>G) Allel Dağılımları ile Hastaların Klinik, Prognostik Parametrelerinin Değerlendirilmesi	55

Tablo 18 : Mide Kanserli Hastalarda p16 540C→G, p16 580C→T, MDM2 (SNP309 T>G) Genotip Dağılımları ile Hastaların Klinik, Prognostik Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	56
---	----

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 : Hücre Döngüsü Fazları (7).	4
Şekil 2 : Hücre Siklusu ve Kontrol Noktaları (9).	5
Şekil 3 : Retinoblastom proteinine (pRb) bağlı G1/S geçisi (9).	6
Şekil 4 : Kanserin başlaması (21).	7
Şekil 5 : Knudson'ın iki vuruş hipotezi (98).....	16
Şekil 6 : Kolon kanserinde moleküler düzeyde çok aşamalı gidiş (112).....	20
Şekil 7 : Retinoblastoma Proteini ve E2F Faktörü (7).....	22
Şekil 8 : Fizyolojik şartlarda p53 proteinin MDM2 proteini tarafından etkisizleştirilmesi (133).....	23
Şekil 9 : p16 540C→G Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü	35
Şekil 10 : p16 580 C→T Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü	36
Şekil 11 : MDM2 SNP309 (T>G) Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü	37
Şekil 12 : p16 540 C→G ve 580 C→T PZR ürünlerinin %2'lik jeldeki görüntüsü (50 bç markır)	38
Şekil 13 : MDM2 SNP309 (T>G) PZR ürünlerinin %2'lik jeldeki görüntüsü (50 bç markır)	39
Şekil 14 : p16 540C→G Kesim Ürünlerine Ait Bulgular (50 bç markır).....	40
Şekil 15 : p16 580 C→T Kesim Ürünlerine Ait Bulgular (50 bç markır)	40
Şekil 16 : MDM2 SNP309 (T>G) Kesim Ürünlerine Ait Bulgular (50bç markır).....	41

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

CDK: Siklin bağımlı kinaz

CAK: CDK aktive eden kinaz

CDKI: Siklin bağımlı kinaz inhibitörler

MDM2: Murine Double Minutes

3'UTR: 3' kodlamayan bölge

pRb: Retinoblastoma

H.pylori: *Helicobacter pylori*

MALT: Mukoza ilişkili lenfoid doku

IF: İntrisink faktör

EBV: Epstein-Barr virüsü

HNPCC: Kalıtsal polipoz olmayan kolon kanseri

FAP: Ailesel adenomatöz polipozis

APC: Adenomatöz polipozis koli

BRCA1/BRCA2: Meme kanseri tip 1/tip 2 duyarlılık proteinleri

LOH: Heterozigotluğun kaybedilmesi

MSI: Mikrosatelit instabilitesi

hTERT: İnsan telomeraz revers transkripaz

TGF: Tümör büyüme faktörü

EGF: Epidermal büyüme faktörü

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

bFGF: Temel fibroblast büyüme faktörü

OR: Risk kat sayısı

CI: Güvenirlilik aralığı

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

ÖZET

Tuna G. Mide ve Kolorektal Kanserli Hastalarda p16, MDM2 Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans. İstanbul 2011.

CDKN2A (p16, MTS-1, INK4a) önemli bir tümör baskılayıcı proteindir. p16 gen ürünleri CDK4 ve CDK6 siklin bağımlı kinaz proteinlerine bağlanarak, bu moleküllerin siklin D1 ile olan ilişkilerini negatif yönde etkiler. p16'nın kodlanma ve 3'UTR bölgelerindeki polimorfizmleri kanser gelişimi ve prognozu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. MDM2, p53'ün negatif düzenleyici proteinidir ve p53'e direkt olarak bağlanarak lokalizasyonunu, stabilitesini ve aktivitesini etkiler. MDM2 promotor bölgesi polimorfizmi bir çok kanser tipiyle ilişkilidir. MDM2 geninin birinci intronunun 309. nükleotidinde meydana gelen T-G baz değişiminin MDM2, RNA ve protein düzeylerinin artışına sebep olduğu, sonrasında p53 yolağının baskılandığı bildirilmiştir. Çalışmamızda hasta grubuna 87 kolorektal kanserli hasta, 35 mide kanserli hasta ve kontrol grubuna da 75 sağlıklı kişi katılmıştır. Elde edilen DNA örneklerinde ise p16 ve MDM2 gen polimorfizimleri PCR, RFLP ve jel elektroforezi teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Sonuç olarak; Türk toplumunda p16 540C→G genotip dağılımı GG: %17,3 GC:%48 CC:%34,7 ve C allel frekansı %58,7, G allel frekansı ise %41,3 olarak saptanmıştır. Türk toplumunda p16 580C→T genotip dağılımı TT: %4 CT:%24 CC:%72 ve T allel frekansı %16, C allel frekansı ise %84 olarak saptanmıştır. Türk toplumunda MDM2 SNP 309 genotip dağılımı TT: %20 GT:%49,3 GG:%30,7 ve T allel frekansı %44,7, G allel frekansı ise %55,3 olarak saptanmıştır. p16 540C→G CC genotipi ve C allel frekansı mide ve kolorektal kanserli hastalarda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$). p16 580C→T ve MDM2 SNP309 gen polimorfizmi hastalığın riski, klinik ve patolojik parametreleri açısından incelendiğinde gerek mide gerek kolorektal kanserli hastalarda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan bir anlamlılık göstermemiştir. Yapılan kombine genotip analizleri sonrasında p16 540C→G ve p16 580C→T combine genotiplerinden CCCC kolorektal ve mide kanserli hasta gruplarında diğer tüm kombinasyonlara göre daha yüksek frekansta olup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark istatistiksel ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Çalışmamızın kolorektal ve mide kanserleri etyopatogenezinde p16 ve MDM2'nin önemini araştırarak çalışmalara ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Mide Kanseri, Kolorektal Kanser, MDM2, p16, Polimorfizm

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4489

ABSTRACT

Tuna G. Investigation of p16, MDM2 gene polymorphisms in gastric and colorectal cancer patients. İstanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine. İstanbul 2011.

CDKN2A (p16, MTS-1, INK4a) is an important tumor suppressor gene. The p16 gene products effects the interaction of CDK4 and CDK6 cyclin kinase proteins with cyclin D1 negatively by binding them. It is reported that the coding of the p16 and the cancer development and prognosis of the polymorphisms in 3' UTR regions. MDM2 is the negative regulatory protein of p53 and effects the localization, stability and activity of p53 by binding directly. It is reported that the T-G base transition which occurs at the 309. Nucleotide at the first intron of MDM2 gene causes increasing of the RNA and protein levels and subsequently the p53 pathway is suppressed. Methods: The p16 and MDM2 polymorphisms will be analysed by the means of the techniques which are PCR-RFLP and the agarose gel electrophoresis. We are of the opinion that our study offer an insight into the other studies which will analyse the importance of these two gen polymorphisms in the etiopathogenesis of gastric or colorectal cancer. For the study we collected the samples of 87 patients with colorectal cancer, 35 patients with gastric cancer and 75 healthy volunteers as control. p16 and MDM2 gene polymorphisms are analysed with the collected samples through PCR, RFLP and gel electrophoresis. As a result; p16 540C→G genotype distribution was found as GG: 17,3 % GC: 48 % CC: 34,7 % and C allele frequency 58,7 %, and G allele frequency 41,3 % in Turkish population. p16 580C→T genotype distribution was found as TT: 4% CT: 24% CC: 72 % and T allele frequency was found as 16 %, and C allele frequency was found as 84 % in Turkish population. MDM2 SNP 309 genotype distribution was TT: 20 % GT: 49,3% GG: 30,7 % and T allele frequency was 44,7 %, G allele frequency was 55,3 % .p16 540C→G CC genotype and C allele frequency was statistically much more higher in colorectal and gastric cancer patients compared to the control group ($p<0,001$; $p<0,001$ respectively).p16 580C→T and MDM2 SNP309 gene polymorphism had no important result, when evaluated in terms of risk, clinicopathologic parameters both in colorectal and gastric cancer. Combined genotype analysis revealed that p16 540C→G and p16 580C→T combined genotypes had higher frequency in CCCC colorectal and gastric cancer patient groups than all other combinations. When compared with control, the difference was statistically meaningful ($p<0,001$). We are of the opinion that our study offer an insight into the other studies which will analyse the importance of these two gen polymorphisms in the etiopathogenesis of gastric or colorectal cancer.

Key Words: Gastric Cancer, Colorectal Cancer, MDM2, p16, Polymorphism

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 4489

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde tüm dünyada yaklaşık 22 milyon kanserli hasta bulunmaktadır. Yeni vakalar göz önüne alındığında en sık rastlanan kanserler akciğer (1.2 milyon), meme (1.05 milyon), kolon-rektum (945 000), mide (876 000) ve karaciğer (564 000) olarak sıralanmaktadır.

Kanser somatik hücrelerde, başlıca mutasyonlar sebebiyle baş göstermektedir. Fakat tek bir mutasyonun değil birden fazla genetik aksaklığın birikimi sonucu meydana gelmektedir. Bu nedenle insanlarda tümör gelişimi aşamalı ve zamana dayalı bir süreçtir.

Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kontrolünde olan bozukluklar, normal hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasında oldukça önem taşımaktadır. Tümör gelişiminde siklin bağımlı kinaz (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitör (CDKI) ailelerinde meydana gelen genetik değişiklik ve hasarlar sonucu, kontrol edilemeyen hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının olduğu düşünülmektedir. Siklin bağımlı kinaz ailesi, katalitik partnerleri olan siklin proteinleri ile hücre çoğalması sırasında görev yapan ve hücre döngüsünün devam etmesini sağlayan bir grup protein ailesidir. Siklin bağımlı kinaz ailesinin fonksiyonları siklin bağımlı kinaz inhibitörleri tarafından inhibe edilmekte ve döngü duraksatılmaktadır.

CDKN2A (p16, MTS-1, INK4a) önemli bir tümör baskalayıcı proteindir. p16 gen ürünleri CDK4 ve CDK6 siklin bağımlı kinaz proteinlere bağlanarak, bu moleküllerin siklin D1 ile olan ilişkilerini negatif yönde etkiler. Siklin D1 ve CDK4/6 komplekslerinin inhibisyonu retinoblastoma proteininin fosforilasyonunu engeller ve döngünün G1/S geçişinin duraksatılmasına sebep olur. p16'nın inaktivasyonu hücre proliferasyonunu arttırmakta ve malignitenin gelişimine katkıda bulunmaktadır. p16'nın kodlanma ve 3'UTR bölgelerindeki polimorfizimlerin kanser gelişimi ve prognozu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bazı polimorfizimlerin p16'nın fonksiyonlarını değiştirdiği bazılarınsa fonksiyonları üzerine etki etmediği gözlemlenmiştir.

Son zamanlarda üzerinde durulan MDM2 promotor bölgesi polimorfizmi bir çok kanser tipiyle ilişkilidir. p53, hücresel stres, DNA hasarları ve onkogenik süreçte aktive olan DNA tamirlerinin başlatılmasında hücre döngüsünün duraksatılmasında ve

apoptozda etkili olan bir tümör baskılayıcı gendir. MDM2, p53'ün negatif düzenleyici proteinidir ve p53'e direkt olarak bağlanarak lokalizasyonunu, stabilitesini ve aktivitesini etkiler. MDM2 geninin birinci intronunun 309. nükleotidinde meydana gelen T-G baz değişiminin MDM2, RNA ve protein düzeylerinin artışına sebep olduğu ve sonrasında p53 yolağının baskılandığı bildirilmiştir. Fonksiyonlarına normal şekilde devam eden hücrelerde p53 proteini, düşük yoğunlukta ve kısa yarı ömre sahip olarak bulunmaktadır. Bu durum p53 proteinin düzenleyicisi olan MDM2 proteini ile sağlanır. Sporadik yumuşak doku sarkomlarının yaklaşık %20'sinde p53 mutasyonları ve p53, MDM2 proteinlerinin aşırı ekspresyonlarının sonucu olarak hayatta kalma süresinin azalmakta olduğu rapor edilmiştir.

Hücre döngüsünde düzenleyici olarak görev yapan proteinlere ait genlerde rastlanan çeşitli polimorfizmler ve bunların görülme sıklıkları ırklara bağlı olarak değişebilmektedir. p16'ya ait gen polimorfizm çalışmaları günümüzde önem kazanmıştır.

Kanserde risk belirleme parametrelerinden biri olabileceği düşünülen gen polimorfizm çalışmaları pek çok yaygın kanser türlerinde de hücre proliferasyonu ile ilgili pek çok gen üzerinde yürütülmektedir. Çalışmamızda, p16 ve MDM2 gen polimorfizmleri mide ve kolorektal kanserli hasalarda incelenecektir. Mide ve kolorektal kanserlerine ait risk durumları, p16 ve MDM2 genotiplerinin klinik diğer parametrelerle ilişkileri değerlendirilmeye çalışılacaktır. Çalışmamızın kolorektal ve mide kanserleri etyopatogenezinde p16 ve MDM2'nin önemini araştırarak çalışmalara ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

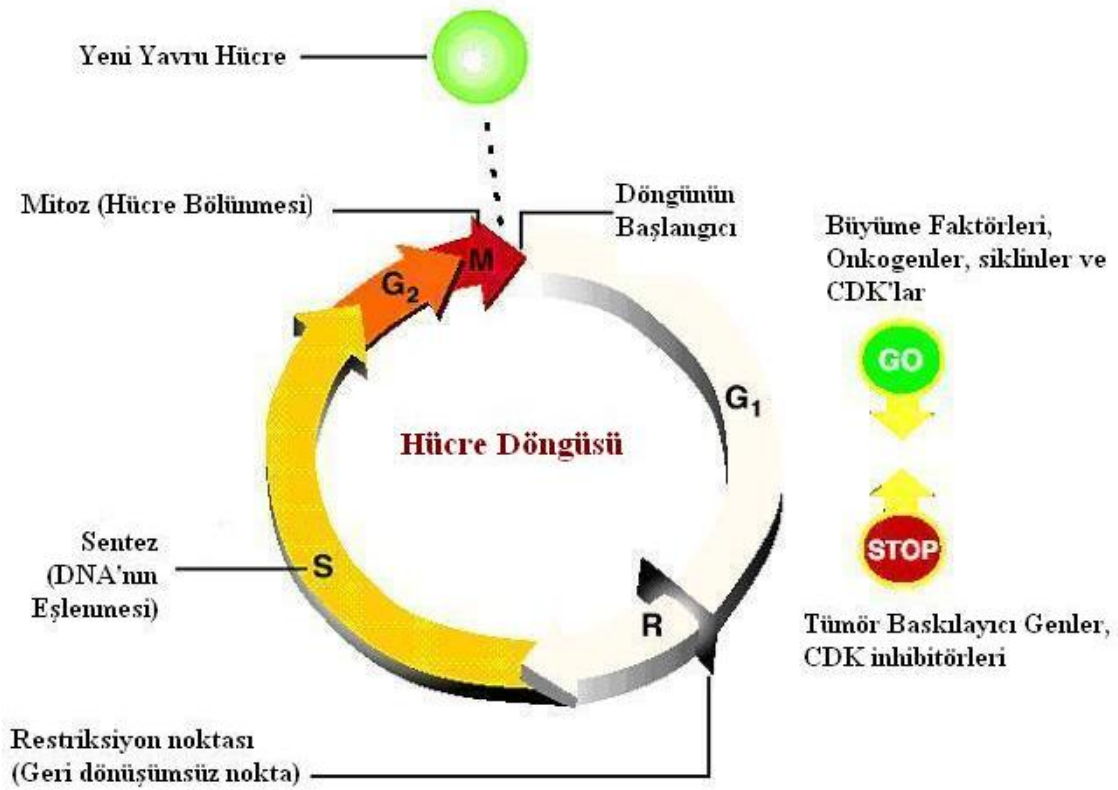
2. GENEL BİLGİLER

Özefagus, mide, barsaklar, karaciğer, safra yolları, pankreası kapsayan gastrointestinal sistemden birçok kanser orjin almakta, dolayısıyla, vücudun diğer herhangi bir sistemine göre daha fazla, kanserden ölüme neden olması sürpriz değildir (1,2,3). Gastrointestinal kanserleri tüm dünyada akciğer ve meme kanseri ile birlikte en sık görülen malign tümörlerdir. Kanserden ölümlerin yaklaşık %25'i gastrointestinal malignitelerden olmaktadır (4). Bu malignitelerin insidansı tutulan organa bağlı olarak ülkeden ülkeye geniş değişkenlik göstermektedir. Örneğin mide kanseri; Japonya'da yaygın görülürken, kolorektal kanser; Kuzey Amerika, Batı Avrupa gibi endüstrileşmiş ülkelerde daha sık görülmektedir (1,2).

Günümüzde yaklaşık 22 milyon kanserli hastanın sırasıyla akciğer, meme, kolon-rektum, mide ve karaciğer kanseri olduğu bilinmektedir (5).

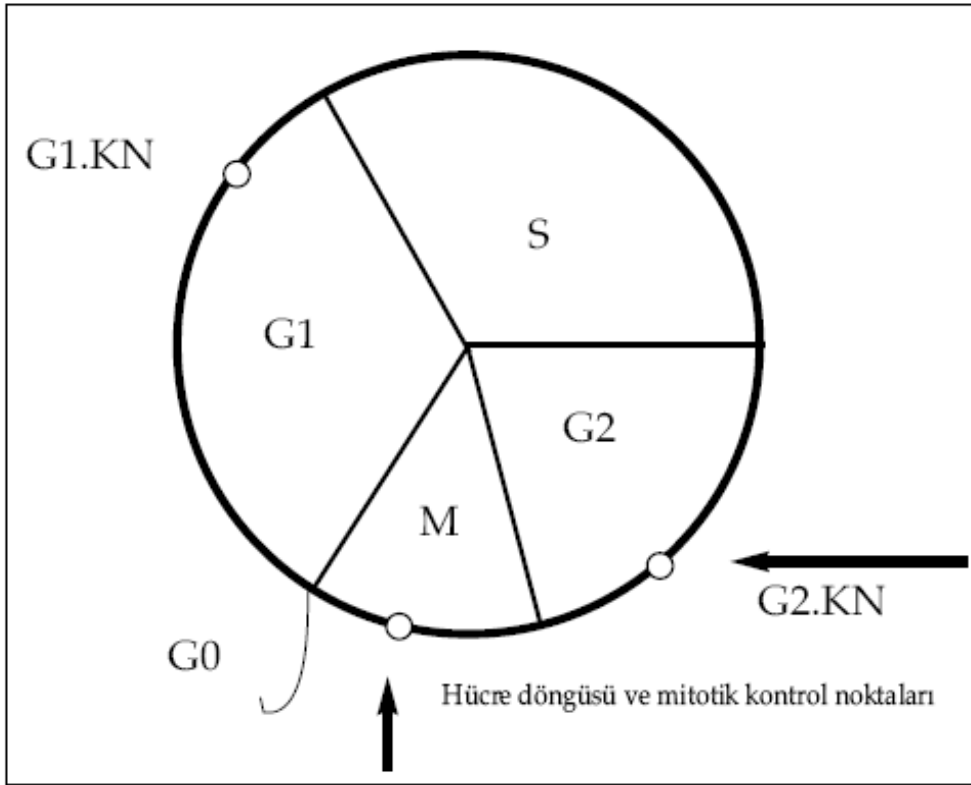
2.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ VE KANSER

Hücre döngüsü, hücrenin büyüme ve farklılaşması DNA hasar tamir mekanizmalarının düzenlenmesini, yaralanmalara karşı doku cevabını ve kanser gibi çeşitli hastalıkları içeren karmaşık bir süreçte yer almaktadır. Bu döngü hücreyi mitoz ve iki kardeş hücre oluşumu ile sonuçlanan bir dizi özgül reaksiyona doğru yönlendiren çeşitli düzenleyici proteinleri kapsar. Bu sürecin merkezinde siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin proteinleri yer almakta olup, döngünün G₁, S, G₂, M fazlarına geçişini düzenlemektedirler (6).



Şekil 1 : Hücre Döngüsü Fazları (7).

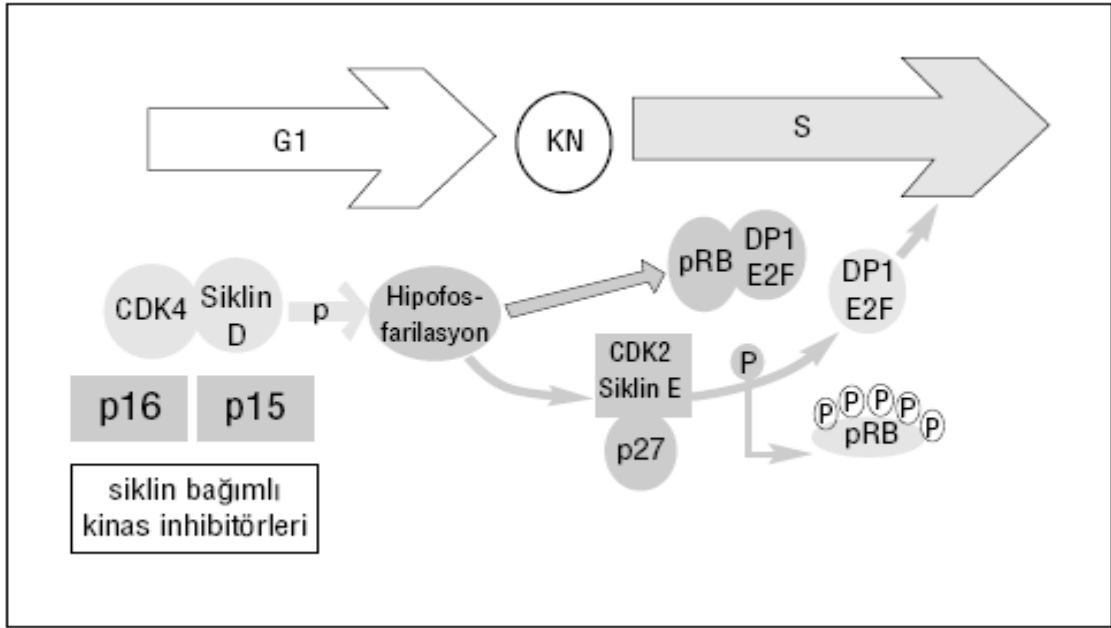
Hücre döngüsü 4 fazda tamamlanmaktadır. G₁ fazı DNA replikasyonu için bütün hazırlıkların yapıldığı dönemdir. DNA replikasyonunu S fazında gerçekleştirir. G₂ mitotik faza hazırlıkların yapıldığı ara dönemdir ve genomik materyalin yavru hücrelere dağıtımı için içciklerin düzenlendiği fazdır. Hücre döngüsü boyunca G₁, G₂ ve mitotik fazda kontrol noktaları bulunmaktadır. Bu kontrol noktalarında hücrenin döngüye devam edip etmeyeceğine karar verilir. G₁ fazı, erken G₁ ve geç G₁ olarak ayrılmaktadır. Erken G₁ sonunda, G₁ kontrol noktası bulunmaktadır. G₂ kontrol noktası ise DNA'nın uygun şekilde kopyalanıp, kopyalanmadığını kontrol edilir. Uygun kopyalanma olmamışsa DNA'nın tamiri yapılmaya çalışılır. Bu da mümkün değil ise hücre kendini ölüme götürür. Bu nedenle G₂ kontrol noktası internal kontrol noktası olarakta bilinir. Mitotik kontrol noktası genomik materyalin her iki yavru hücreye eşit şekilde dağıtılmasından sorumludur (8).



Şekil 2 : Hücre Siklusu ve Kontrol Noktaları (9).

Hücre döngüsünün ilerlemesi siklin proteinleri ve siklin bağımlı kinazlar tarafından düzenlenir (10). Memeli hücrelerinde, siklin D izoformları ile kompleks oluşturmuş CDK4 veya CDK6 ve siklin E ile birleşmiş olan CDK2, G1 fazının ilerlemesini kontrol eder. Bu kompleksler CDK aktive eden kinaz (CAK)'ın CK'yi fosforile etmesi ile aktive edilirler. G1 CDK'larının belli başlı substratı retinoblastoma gen ürünüdür (pRB). Hücre döngüsünün ilerlemesi hipofosforile olmuş pRB proteini tarafından engellenmesine rağmen pRB'nin fosforilasyonu bu etkiyi ortadan kaldırır (11,12). pRb bu rolünü heteromerik E2F/DP1 transkripsiyon faktörüne bağlanıp onu inaktive etmesiyle gerçekleştirir (13).

CDK4-siklin D kompleksi, Rb proteini hipofosforilasyon halinde bulunur. Hipofosforilasyon halindeki pRb hücrenin G1/S geçişinden sorumlu E2F protein ailesini bağlama kapasitesine sahip olduğundan, döngü G1 kontrol noktasında durdurulur. Ancak CDK2-siklin E kompleksinin pRb'mu daha fazla fosforlaması ile pRb hiperfosforile haline gelir ve E2F proteinlerini bağlayamadığından S fazına geçiş gerçekleşir (şekil 2.3) (9).

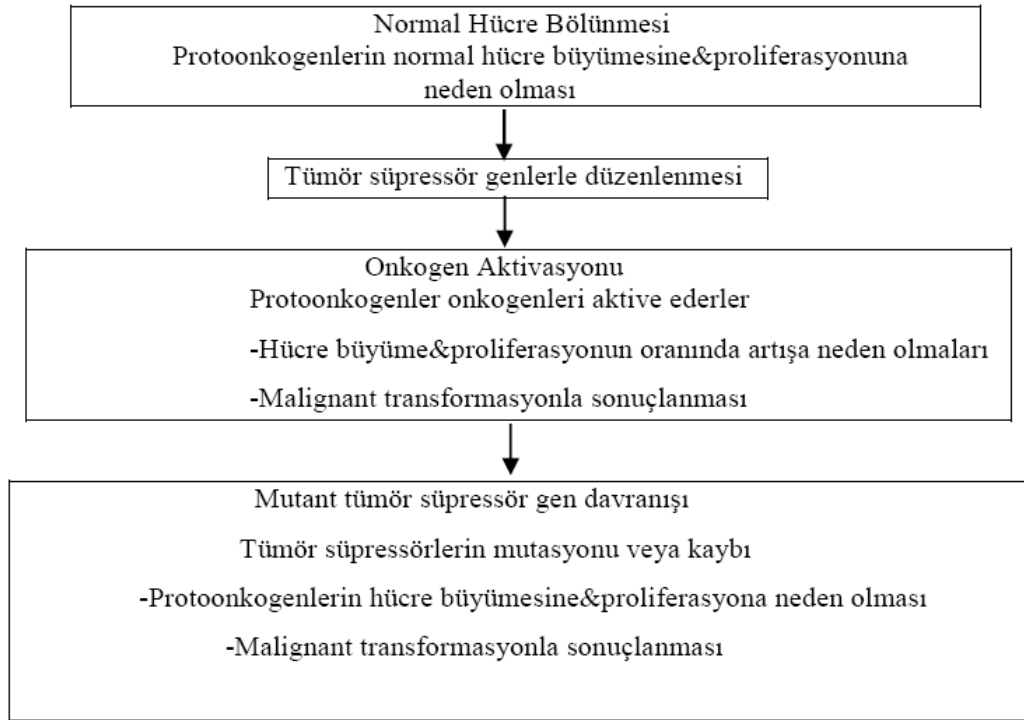


Şekil 3 : Retinoblastom proteinine (pRb) bağlı G1/S geçisi (9).

Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) olarak bilinen hücre döngü inhibitör proteinleri siklin bağımlı kinazların (CDK) aktivitesini kontrol eder. Bu proteinler CYC-CDK kompleks oluşumunu ve DNA replikasyonunu inhibe eder. CDKI'lar hücre siklusunu frenlediklerinden tümör baskılayıcı genlere de adaydırlar. Etkiledikleri CDK ve inhibisyon mekanizmalarına göre iki farklı CDKI ailesi vardır. Bunlardan INK4 ailesinden p15, p16, p18, p19 G fazındaki CDK4 ve CDK6'yı bağlayarak CYC-CDK kompleks oluşumunu inhibe eder. Cip/Kip ailesinden ise p21, p27 ve p57 bulunmaktadır (14,15,16,17,18).

İnsan kanserlerinde saptanan yüksek p53 geni mutasyon görülme sıklığı, p53'ün tümör gelişimindeki önemli ve kritik olaylar dizisinde işlevlere sahip olduğunun göstergesidir (19). p53 bu işlevlerini gen transkripsiyon kontrolü, DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, genomik stabilite, kromozom segregasyonu, senesens, anjiyogenez, apoptoz ve tümör baskılanması gibi hücresel süreçlerde direkt ya da sahip olduğu moleküler etkileşimler yolu ile yerine getirmektedir (20). Tüm bu işlevleri ve özellikle tümör gelişimini baskılayıcı rolleri ile 'genomun koruyucusu' olarak tanımlanan p53 proteini DNA hasarı, hipoksi, nükleotid havuz depleksyonu, viral enfeksiyonlar ve

onkogen aktivasyonu gibi çeşitli genomik stres durumlarında aktive olmaktadır. Ancak p53 (doğal tip p53) işlevinin bozulması, kanser gelişimini baskılayan hücre içi yolların işlevlerinin bozulmasına neden olmakta ve bu durum hücrenin kanserleşme sürecine katkıda bulunmaktadır (19).



Şekil 4 : Kanser başlaması (21).

2.2. MİDE KANSERİ

Mide kanseri dünyada en yaygın görülen dördüncü kanser türü olup, kanserle ilişkili ölümlerin en sık ikinci nedenidir (22). Mide karsinomunun görülme sıklığı dünyada çok büyük değişkenlik göstermektedir (23).

Mide tümörleri genelde malign karakterdedir. Malign mide neoplazmların %95'inden fazlası adenokarsinomlar olup, geri kalanın %5'i lenfomalar, leiomyosarkomlar ve daha az sıklıkta karsinoid tümörler, karsinosarkomlar ve skuamöz hücreli karsinomlar oluşturmaktadır (24). Gastrik adenokarsinomlar histopatolojik olarak intestinal ve diffüz tip olmak üzer iki ayrı gruba ayrılırlar. İntestinal tip mide adenokarsinomlarının sıklıkla ülserlerle karakterize prekanseröz bir dönemleri vardır,

yaşlılarda daha sık görülür (25). Diffüz karsinomlar ise genç hastalarda daha sık görülür, özellikle kardiya başta olmak üzere midenin her tarafında görülebilir ve prognozları daha kötüdür. Mide kanseri prevalansının yüksek olduğu coğrafik bölgelerde intestinal tip predominantlığı vardır. Oysa diffüz tip mide kanserleri dünyanın her tarafında eşit prevalansa sahiptir. Intestinal tip mide kanserlerinin sıklığındaki azalmaya bağlı olarak, içinde bulunduğumuz yüzyıl boyunca gastrik kanser sıklığında da azalma gözlenmiştir (25,26,27).

Mide kanserleri genellikle sporadik olmasına rağmen %8-10 arasında ailevi komponent içerebilir (28). Ayrıca kalıtsal polipoz olmayan kolon kanseri, gastrointestinal polipozis sendromu, ailevi polipozis koli sendromu ve Peutz-Jeghers sendromunun bir parçası olarak da görülebilir (29).

2.2.1. MİDE KANSERİ RİSK FAKTÖRLERİ

2.2.1.1. Helicobacter Pylori :

(H.pylori) Bakteri enfeksiyonu mide kanserinde önemli bir neden olarak görülmektedir. Özellikle midenin alt bölümündeki kanserlere neden olmaktadır. Uzun süreli mide enfeksiyonlarında bu bakteri iltihaba (kronik atrofik gastrit) ve kanser öncesi midenin iç zarında değişikliklere yol açabilir (30). Atrofik gastritlerin %15'inde 15 yıl içinde mide kanseri gelişebilmektedir. Bu nedenle atrofik gastrit prevalansının yüksek olduğu bölgelerde mide kanseri prevalansı da yüksektir (31).

H.pylori, gram (-), unipolar, kıvrımlı veya spiral, hareketli, kunt ve yuvarlak uçlu, 4-6 unipolar kirpiğe sahip, mikroaerofilik, 0.5-1 mikrometre genişliğinde, 2.5-4 mikrometre boyunda bir bakteridir (32). H.pylori koloni halinde ve asidik mide ortamında yaşar, pH 6 ile 8 arasında olduğunda en iyi şekilde gelişim gösterir (33). H.pylori gastrik asit sekresyonunu arttırarak gastrite ve ülsera neden olan bir bakteridir (31).

H.pylori virulansı cagA, vacA, iceA ve babA genleri ile ilişkilidir. cag adaları, H.pylori virülans faktörünü en iyi karakterize eden cag patojenite adasıdır (CAG-PAI), 40kb kromozomal DNA, yaklaşık 31 gen içerir (34,35). H.pylori suşları cag-PAI varlığına/yokluğuna göre 2 gruba ayrılabilir; -tip 1 suşları cag-PAI'ya sahipken, -tip 2 suşları cag-PAI'ya sahip değildirler. Tip 1 suşları şiddetli gastrit, peptik ülser hastalığı, gastrik atrofi ve non-kardia mide kanseri ile ilişkili olup PAI varlığı ile virülansın arttığı

ortaya konulmuştur (36,37,38). Tüm H.pylori suşları vacA genine sahip olmasına rağmen, suşların sadece yaklaşık %50'si vacA proteinini ifade eder. Ekspresyondaki değişiklikler gen dizilerinin varyasyonundan kaynaklanmaktadır (39). babA gen ekspresyonu ile H.pylori suşları mide epitel hücrelerine daha sıkı bağlanır ve babA gen ekspresyonunun hastalık şiddetini etkilediğine dair önemli kanıtlar bulunmaktadır. H.pylori suşlarından babA, vacA ve cagA genlerine sahip olanların mide kanseri olma riski daha fazladır (40). iceA geninin iki ana varyantı bulunur (iceA1 ve iceA2). iceA1'in ekspresyonu H.pylorinin insan mide epitel hücreleri ile temasta olması ile düzenlenir ve bazı popülasyonlarda peptik ülser hastalığı ile ilişkilidir (41).

Mide kanserli hastalarda, mide kanserli olmayan hastalara göre enfeksiyon daha yüksek bir oranda görülür. H.pylori enfeksiyonu bazı mide lenfoması tiplerine bağlıdır. Buna rağmen, bu bakteriyi midesinde taşıyan çoğu insanda kanser gelişmeyebilir (30).

2.2.1.2. Mide Lenfoması:

Mide lenfoma çeşitlerinden, mukoza ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoması tedavisi gören kişilerin mide kanseri olma riskinin arttığı görülmüştür. H.pylori bakterisinin enfeksiyonu mide MALT lenfomasına neden olur (30).

2.2.1.3. Cinsiyet:

Mide kanseri hemen hemen tüm ülkelerde erkeklerde kadınlara oranla 1.2-2.5 kat daha fazla görülmektedir. Intestinal tipte bu oran 2/1 iken , diffüz tipte ise erkek kadın oranı eşittir. Bu erkek baskınlığı mide kanser insidensinin yüksek veya düşük olduğu tüm ülkeler için geçerlidir (42,43).

2.2.1.4. Irk:

Amerika'da, mide kanseri İspanyol kökenli Amerika'lılarda ve Afrika kökenli Amerika'lılarda, İspanyol kökenli olmayan beyazlara göre daha yaygındır. En fazla ise Asya ve Pasifik okyanusundaki adalarda bu kanser türüne rastlanır (30).

2.2.1.5. Coğrafya:

Bireyin yaşadığı yer kansere yakalanma bakımından önemli olabilir. Mide kanseri Japonya ve Çin'de yaygın olmakla beraber, Güney ve Doğu Avrupa İle Güney ve Orta Amerika'da da görülür. Kuzey ve Batı Afrika, Güney Orta Asya ve Kuzey Amerika'da ise daha az yaygındır (30).

2.2.1.6. Diyet:

Beslenme ile mide kanseri arasında direkt ve önemli bir ilişki vardır. Mide kanserlerinin aşırı tuzlu beslenme ile ilişkili olduğu ve taze sebze-meyve ile beslenmenin de koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (44). Gıdalarla alınan nitrat ve nitritlerin midede intestinal metaplaziye yol açarak mide kanseri oluşturdıkları deneysel olarak gösterilmiştir. Gıdalarla bu zararlı maddelerin alınımının önlenmesi, özellikle yüksek riskli bölgelerde önleyici tedbir olabilir. Bol sebze ve meyve ile beslenenlerde kanserin gelişme oranı düşmektedir. Az tüketenlerde ise mide kanser oranının yüksek olduğu bildirilmiştir (44,45).

2.2.1.7. Sigara:

Sigara kullanımı mide kanseri riskini artırır. Mide kanseri riski sigara içenlerde içmeyenlere göre iki kat daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (30).

2.2.1.8. Obezite:

Aşırı kilolu bireylerde midenin üst kısmı yemek borusuna yakın olduğu için kanser olma riski taşıdıkları ortaya çıkmıştır (30).

2.2.1.9. Daha Önceden Geçirilen Mide Ameliyatı

Midesinin bir kısmı ülser gibi kanser olmayan hastalıklar için alınmış kişilerde mide kanserinin gelişmesi muhtemel bir durumdur. Bu durum, daha fazla nitrit üreten bakterilerin bulunmasına izin vermesinden kaynaklanabilir. Ayrıca, ülser ameliyatı sonrasında asit üretimi azalır ve ince bağırsaktan geçerek mideye gelen safra reflüsü olabilir. Cerrahiden 15-20 yıl sonra risk artmaya devam eder (30).

2.2.1.10. Pernisiyöz Anemi:

Midenin zarını kaplayan bazı hücreler normalde bir madde yapmak için besinlerinden B12 vitamini emilimine ihtiyaç duyarlar. Buna intrinsik faktör (IF) denir. IF yeterli olmayan kişilerde vitamin B12'nin yetersizliği ile son bulabilir. Bu da vücudun kırmızı kan hücre yapma yeteneğini etkiler. Anemi (düşük alyuvar sayısı) ile birlikte, bu hastalığa sahip olan kişilerde kanser olma riski daha fazladır (30).

2.2.1.11. Menetrier Hastalığı (Hipertrofik Gastropati):

Mide zarındaki aşırı büyüme, zarda büyük kıvrım oluşumunu ve düşük seviyedeki mide asidini yöneten bir durumdur. Bu hastalık çok nadir olduğu için mide kanseri riskini ne kadar etkilediği bilinmiyor (30).

2.2.1.12. A Kan Grubu:

Kan grubu A olan kişilerde diğer kan gruplarına sahip kişilere göre mide kanseri riski daha yüksektir. Bu özellikle diffüz tip için geçerlidir. Bunun aile hikayesi ve taşınan onkogenlerle ilgili olduğu düşünülmektedir (46)

2.2.1.13. Ailede Mide Kanseri Hikayesi

Birinci dereceden yakınlarında mide kanseri olan kişilerde bu hastalığın gelişme olasılığı fazladır (30).

2.2.1.14. Bazı Mide Polip Türleri

Polipler kanser olmayan mide zarı üzerinde büyürler. Çoğu polip türlerinin (hiperplastik polip ya da inflamatuvar polip gibi) kişinin mide kanseri riskini arttırdığı konusu tartışmalı olup, adenomatöz polip ya da adenomların bazen kansere dönüşebildiği bilinmektedir (30).

2.2.1.15. Epstein-Barr Virüs Enfeksiyonu

Mide kanseri saptanan kişilerde Epstein-Barr virüsü (EBV) antikoru saptanması dikkat çekmiştir. Yapılan bir çalışmada, EBV antikoru pozitif olan sağlıklı kişilerin, EBV negatif olanlara göre mide kanserine yakalanma riski yaklaşık 4 kat fazla bulunmuştur (47). EBV virüsü ile enfekte mide kanserlerindeki lenfosit ve özellikle aktif T-hücre infiltrasyonu bu kanserlerin lenfomadan ayrımını güçleştirmektedir (48).

2.2.1.16. Sosyo-ekonomik durum:

Midede kanser gelişme riski, düşük sosyo-ekonomik ülkelerde gelişmiş ülkelere göre iki misli daha fazladır. Bu daha çok intestinal tip için geçerlidir. ABD’de siyahlarda gastrik kanser riskinin beyazlara göre iki misli yüksek olmasının düşük sosyo-ekonomik duruma bağlı olduğu ileri sürülmektedir (49).

2.2.1.17. Meslek:

Bazı meslek ve iş kollarında mide kanseri insidensi yüksektir. Maden, kömür, tekstil, seramik, metal endüstrisi, boya sanayisi, kimyasal, lastik ve petrol sanayisi gibi iş kollarında çalışan işçilerin asbest, poliaromatik hidrokarbon ve nitroz komponentleri gibi karsinogenlere maruz kalmaları sonrası ve bu karsinogenlerin etkisi ile mide kanseri risklerinin oldukça arttığı bilinmektedir (50).

2.2.1.18. Kalıtsal Kanser Sendromları:

Bazı kalıtsal özellikler kişinin mide kanseri olma riskini arttırabilmektedir.

Kalıtsal Yaygın Mide Kanseri: Bu kalıtsal bir sendrom olup, mide kanserine yakalanma riskini büyük oranda arttırır. Bu durum oldukça nadirdir, ancak yaşam boyunca mide kanseri riskinden etkilenen kişiler %70-80 arasındadır. Bu sendromu olan kadınların belirli bir türde meme kanserine yakalanma riski vardır. Bu duruma gendeki (E-cadherin/CDHI) mutasyonlar (defekt) neden olabileceği öne sürülmektedir.

Kalıtsal Non-polipozis Kolorektal Kanser: HNPCC, Lynch sendromu olarakta bilinen kalıtsal genetik bir bozukluktur. Bu nedenler kolon kanseri riskini arttırır. Bu sendromu olan kişilerde mide kanserine yakalanma riski de yüksektir. Çoğu durumda, bu hastalığa MLH1 veya MSH2 genindeki bozukluklar neden olur. Fakat diğer beş farklı gende HNPCC'ye neden olabilir. Bu genlerin; MLH3, MSH6, TGBR2, PMS1 ve PMS2 olduğu saptanmıştır.

Ailesel Adenomatöz Polipozis: FAP bir sendrom olup, bu sendromu olan kişilerin kolonlarında, midelerinde ve bağırsaklarında polipler bulunur. Bu kişilerin kolon kanserine ve mide kanserine yakalanma riskleri vardır. APC genindeki mutasyonların bu duruma neden olduğu bilinmektedir.

BRCA1 veBRCA2: Kalıtsel meme kanseri genleri olan BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarını taşıyan kişilerde mide kanseri daha yüksek bir oranda olabilir (30).

2.2.1.19. Yaş :

Mide tümörleri en sık 50-70 yaşları arasında görülmektedir. Mide tümörlerinin %93.4'ünün 50 yaş üzerinde ortaya çıktığı söylenmektedir. Ortalama olarak görülme yaşı 60 olup, literatürlerde 30 yaşın altında mide kanseri oranı %1 olarak belirtilmektedir (51,52,53)

2.2.2. MİDE KANSERİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI

Çoğu proto-onkogen, değişen histolojik alt türler arasındaki varyasyonlarla gastrik karsinomda aktive olurlar. Hepatosit büyüme faktörü/yayıcı faktörünü kodlayan *c-met* geni, intestinal tip gastrik kanserlerde %19 amplifiye olurken, diffüz tip gastrik kanserde %39 amplifiye olmaktadır (54). K-sam (KATO-III hücrelerince türetilmiş mide kanseri amplifiye olmuş) onkogen de gastrik karsinomlarda sıklıkla aktive olmaktadır ve en az dört tane transkripsiyonel varyantı bulunmaktadır (55). Bu genin gastrik kanserde aşırı ekspresyonu, daha zayıf bir prognoz ile ilişkilidir. Diğer bir proto-onkogen olan *c-erbB2*, genellikle intestinal tip gastrik kanserlerde %20 amplifiye olmaktadır, ancak diffüz tip gastrik kanserde rol aldığı bilinmektedir (56). Bu genin aşırı ekspresyonu daha zayıf prognozla ve karaciğer metastazıyla birlikte seyretmektedir (57,58). K-ras mutasyonları intestinal tip gastrik adenokarsinomlarda, prekürsor lezyonlarda, bağırsak metaplazisinde ve adenomlarda görülmektedir (59,60,61).

p53 tümör baskılayıcı geni, sıklıkla gastrik kanserde heterozigotluğun kaybedilmesi (LOH), yanlış anlam mutasyonu (missense) ve çerçeve kayması delesyonları (frame shift) yoluyla inaktive olmaktadır (60). Mutasyonlar, intestinal tip karsinomlarda genellikle A-T bölgelerinde oluşmakta iken, diffüz tip karsinomlarda GC-AT dönüşümleri ile meydana gelmektedir (62). Bu GC-AT dönüşümlerine, bir çok yiyecekte bulunan karsinojenik N-nitrozaminler neden olabilmektedir ve asidik gastrik ortamda diyetel aminlerden ve nitratlardan üretilmektedir (63,64). pS2, gastrik foveolar epitel hücrelerinde olağan bir şekilde ekspres edilen gastrik-spesifik yonca biçimli bir faktördür (65). Bağırsak metaplazilerinde ve gastrik adenomlarda, pS2 geninin, promoter bölgesinde DNA metilasyonu ile baskılanması veya kaybı söz konusudur ve bu da bu sürecin intestinal tip gastrik kanser gelişiminde erken evrede önemli olabileceğini göstermektedir (66). APC tümör baskılayıcı gendeki mutasyonlar, ailesel polipozis kolide görülmektedir ve aynı zamanda intestinal tip gastrik karsinomlarda da gözlenmektedir. Bir onkogen olarak etki gösteren β -kateninin ekspresyonu APC inaktivasyonunda artmaktadır (67). Diğer bir tümör baskılayıcı gen ise retinoik asit reseptörü β (RAR β) olup , mide kanserinde önemli olduğu düşünülmektedir (68).

RUNX gen ailesi ,*RUNX1/AML1*, *RUNX2* ve *RUNX3* olmak üzere üç genden oluşmaktadır (69). RUNX ailesi, RUNX3, gastrik karsinogenezde, gastrik epitel hücre

proliferasyonunun baskılanmasında rol almaktadır. İnsanlarda, %64 oranında gastrik kanser de dahil olmak üzere birçok farklı kanser türünde, RUNX3'ün promotor CpG adalarındaki hipermetilasyon ile fonksiyonunun kaybı gözlenmektedir (70).

Gastrik karsinogenezde etkilenen diğer genler de, FHIT (fragile histidine triad) geni ve DCC lokusundaki heterozigotluğun kaybolmasıdır ve bu intestinal tip gastrik kanserde görülen bir durumdur (60,71).

Histon H4, gastrik kanserin gelişimi boyunca aşama aşama deasetillenmektedir ve hem intestinal tip hem de diffüz tip gastrik kanserlerde yaygın olarak görülmekte olduğu bildirilmiştir (72).

Hücre adezyon molekülleri, diffüz tip gastrik karsinomlarda %50 oranında görülen E-kaderin genindeki mutasyonlar ile birlikte tümör baskılayıcı genler gibi davranabilmektedirler (73). E-kaderin, bir dizi katenin proteini aracılığı ile aktin hücre iskeletine bağlanmaktadır (74). Bu nedenle, E-kaderin ekspresyonundaki değişikliklerin, hücre adezyonu üzerinde doğrudan bir etkisi vardır ve dolayısıyla kanser gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (75). β -katenin veya γ -katenindeki mutasyonlar aynı zamanda gastrik kanser hücrelerinde de gözlemlenmiştir ve E-kaderin mutasyonları ile birlikte diffüz kanserlerin gelişmesi ve ilerlemesinde rol aldığı düşünülmektedir (76,77,78).

Anormal CD44 transkriptleri, sıklıkla gastrik karsinomlarla ve metastatik katmanlarla ilişkili olmakla beraber intestinal tip ve diffüz tip gastrik kanserler arasında çeşitlilik göstermektedirler (79).

Hücre döngüsü regülatörlerinden olan siklin E regülatörü, aşırı ekspresyonu ile mide karsinomlarda %15-20 amplifiye olmaktadır (80). Çok çeşitli siklin/CDK komplekslerine bağlanarak kinaz aktivitesini inhibe eden CDK inhibitörü p27'nin ekspresyonu, gastrik kanserlerde çoğunlukla baskılanırken, birçok gastrik adenomlarda ve erken evredeki kanserlerde korunmaktadır (81). p27'nin ekspresyonun azalması tümör invazyonu ve nodal metastaz ile ilişkili olup, post-translasyonel evrede meydana gelmektedir ve genetik anomalilerden ziyade übikitin aracılı proteozomal degradasyon sonucu oluşmaktadır (82). E2F transkripsiyon faktörlerinin bir ailesi olup, G1/S dönüşümünde siklinlerin (CDK) önemli bir hedefidir (83).

Mikrosatelit instabilitesi (MSI), gastrik karsinogenezdeki yolaklardan biri olan DNA uyumsuzluğu tamir mekanizmasındaki bozukluğun bir özelliğidir. Mikrosatelitler, insan genomu boyunca yayılmış olan uyumsuzluk tamiri (mismatch repair-MMR) genleri olan *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS2* ve *MSH6/GTBP* genlerindeki germline mutasyonlar ile ilişkili neredeyse tüm gastrik kanser vakalarında ortaya çıkan kısa DNA dizi tekrarlarıdır (84,85).

İnsan telomeraz revers transkriptaz (hTERT), telomeraz aktivitesinin önemli bir belirleyicisidir. Bu enzimler telomer DNA sentezini kataliz etmektedir. Bağırsak kansinonlarının çoğunda telomer uzunluğu kısalmış, telomeraz aktivitesi ve hTERT ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (86).

Mide kanseri hücreleri, otokrin, parakrin ve jukstakrin mekanizmaları aracılığıyla etki gösteren büyüme faktörleri ve sitokinlerin geniş bir dizisini ekspres etmektedirler. EGF, TGF, TGF α , IGF II ve bFGF'yi içermekte olan EGF ailesi, bağırsak türü karsinomda genellikle aşırı ekspres edilmektedir. Bununla birlikte, TGF β , IGF II ve bFGF genellikle diffüz alt tipte aşırı ekspres edilmektedir. Interleukin-1 α 'nın, enflamatuvar hücreler ve gastrik kanser hücreleri tarafından üretildiği bilinmektedir. Otokrin gastrik karsinomda bir büyüme faktörü olarak etki etmektedir ve EGF reseptörü ekspresyonunda öneme sahiptir (87). Negatif büyüme faktörü olan TGF β 'nin , gastrik karsinomlar ve diffüz tip karsinomlarda eksprese olduğu görülmektedir (88).

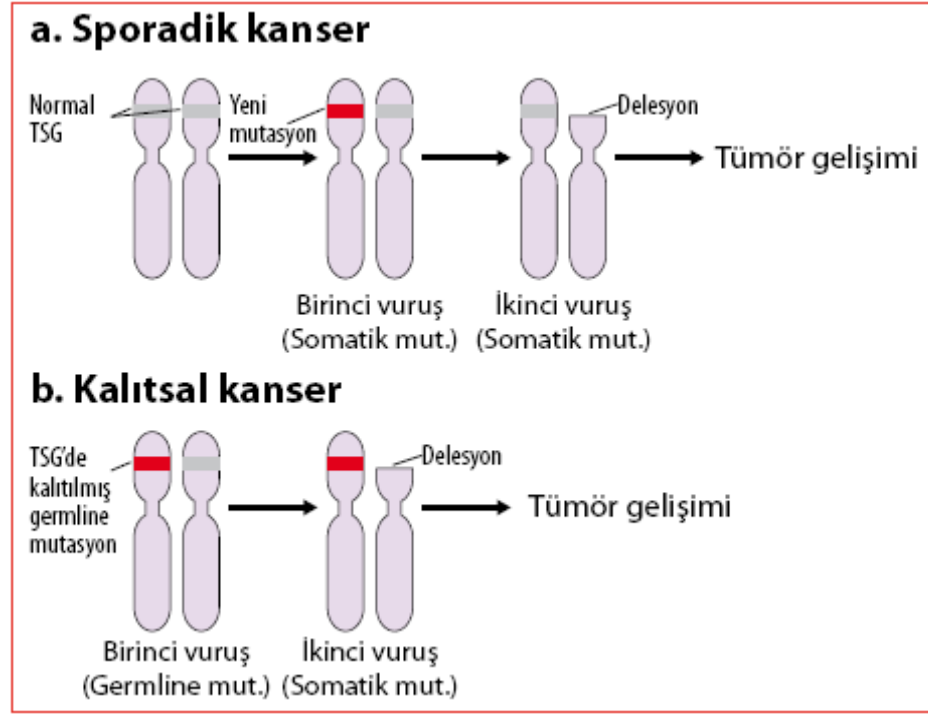
2.3. KOLOREKTAL KANSER

Kolorektal kanser dünyanın önemli insan malignitelerinden biridir. Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (ABD) bir raporuna göre, ABD'de 2009 yılında kolon ve rektal kanserler dünyadaki kanser türleri arasında en ön sıralarda yer almaktadır (89).

Kolorektal kanser, gastrointestinal maligniteler içinde erkeklerde üçüncü, kadınlarda ikinci en sık rastlanan kanserdir (90). Erkek ve kadınlarda görülme oranında bir fark saptanmadığı bildirilmiştir (91).

Kolorektal kanser gelişiminde genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır (92). Eğer bu genetik değişiklikler üreme hücrelerinde oluşursa kalıtsal olarak geçen kanserler, somatik hücrelerde oluşursa sporadik kanserler olarak ifade edilir. Kalıtsal kolorektal kanserlere örnek Familial Adenomatöz Polipozis (FAP) ve Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanserler (HNPCC) verilebilir (93,94)

Kolorektal kanserlerin çoğu sporadiktir (95). Kolorektal kanserlerinin büyük çoğunluğu (%95) adenokarsinomlar olup, ayrıca skuamöz hücreli karsinom, karsinoid tümörler, adenoskuamöz ve indiferansiye karsinomun yanı sıra sarkom ve lenfomalar gibi nonepitelyal tümörler de görülmektedir (96,97).



Şekil 5 : Knudson'ın iki vuruş hipotezi (98).

Knudson'ın iki vuruş hipotezine göre hem sporadik, hem de kalıtsal kanserde, tümör supresör geninin her iki kopyası iki vuruşla inaktive olmaktadır. Kalıtsal olanın farkı, vuruşlardan ilkinin doğuştan itibaren (ve bütün hücrelerde) zaten mevcut olmasıdır. Tümör gelişimi için diğer kopyanın kaybı yeterli olacaktır. Sporadik olanda ise aynı hücrede doğumdan sonra arka arkaya iki vuruş olması gerekmektedir (şekil 2.5) (98).

2.3.1. KOLOREKTAL KANSER RİSK FAKTÖRLERİ

2.3.1.1. Yaş:

Yaşın ilerlemesi ile kolorektal kanseri gelişime riski arasında doğru orantı vardır. Genel popülasyonda 40 yaşından sonra kolorektal kanser gelişme riski artmaya başlar ve her dekatta katlanarak artar. Kolorektal kanserinin %90'dan fazlası elli yaşından sonra gelişir. En sık hastalık görülme yaşı 60-65'tir ve ortalama tanı yaşı 62'dir.

(99,100). Kolorektal kanser geçiren bireyler arasında her on kişiden dokuzu elli yaşın üstünde olduğu bilinir (101).

2.3.1.2. Önceden Geçirilmiş Polips veya Kolorektal Kanser Öyküsü:

Bazı polip türleri, özellikle çok sayıdalar ise kolorektal kanser riskini arttırmaktadır. Eğer bir kişi öncesinde kolorektal kanser geçirilmişse (tamamen alınmış olsa dahi), kolon veya rektumdaki başka alanlardan başlayan yeni kanserlere yakanlanma ihtimali daha yüksektir. Eğer ilk kolorektal kanser gençken geçirilmiş ise bu ihtimal daha da artmaktadır (101).

Adenomatöz polip hikayesine sahip bireylerde kolorektal kansere yakalanma olasılığının arttığı düşünülmektedir. Bir defa kolorektal kansere yakalanmış kişilerde de hastalık tümünden ortadan kalkmış olsa bile, kolon ve rektumun diğer bölgelerinde yeniden kanser gelişebilir (101).

2.3.1.3. Bir Bağırsak Hastalığı Öyküsüne Sahip Olmak:

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi enflamatuvar bağırsak hastalıkları kolon kanseri riskini arttırmakta olduğu öne sürülmektedir (101).

2.3.1.4. Ailede Kolorektal Kansere Öyküsü:

Eğer bu kansere yakalanmış akrabaları (ebeveyn, kardeşler veya çocuklar) olan bireyler varsa, o bireyinde bu kansere yakalanma riski artmış olabilir. Bu özellikle ailedeki birey kansere genç yaşlarda yakalanmışsa daha fazla geçerli olabilmektedir (101).

2.3.1.5. Belirli Aile Sendromları:

Sendrom bir semptomlar grubudur. Kolorektal kanserler ile bağlantılı kalıtsal olan en yaygın iki sendrom ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanserdir (HNPCC). HNPCC; polipozis zemininden gelişen kolorektal kanserlerdir. Sporadik vakalara oranla daha genç yaşlarda görülürler. Familial Adenomatöz Polipozis (FAP) kolonda 100'ün üzerinde adenomatöz polip bulunması ya da FAP ailesi bireylerinden birinde herhangi bir sayıda adenom saptanması ile tanı konulan bir hastalıktır. Sorumlu olan genetik defektin 5.kromozom üzerinde q 21 lokusunda bulunmakta olan APC (adenomatöz polipozis koli) geni olduğu bilinmektedir. HNPCC ise, polipozis sendromları ile ilişkisiz olup Lynch sendromu olarak adlandırılmışlardır ve özellikle otozomal dominant bir kalıtım modeli göstermesi,

kolorektal kanser gelişme yaşının erken olması, kanserlerin çoğunlukla sağ tarafta yerleşik olması ile karakterizedir (101).

2.3.1.6. Irk ve Etnik Köken:

Afrikalılar, Amerikalılar ve museviler gibi bazı ırk ve etnik grupların kolorektal kansere yakalanma riski daha fazladır. Polonya ve Almanya yahudileri arasında, kolorektal kanser riskinin artmasına neden olan bir çok gen mutasyonu bulunmuştur (101).

2.3.1.7. Diyet:

Kırmızı et (dana,kuzu veya ciğer) ve işlenmiş etlerin yoğun bir diyet kolorektal kanser riskini arttırabilmektedir. Çok yüksek ateşte pişirilen etler (kızartma,kavurma veya ızgara) kanser riskini arttıran kimyasallar oluşturabilir. Sebze ve meyvece yoğun diyetler daha düşük kolorektal kanser riski ile bağlantılı olabilmektedir (101).

2.3.1.8. Hareketsizlik:

Bireyin daha fazla egzersiz yapması kolorektal kanser riskinin azalmasına yardımcı olabilir (101).

2.3.1.9. Obezite:

Aşırı kilolu olmanın, kişinin kolorektal kanserine yakalanma riskini arttırmakta olduğu öne sürülür. Obezite kadın ve erkeklerde riski arttıran bir faktör gibi görülmekte, erkeklerde bu faktörün daha etkin bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca kilo ile ilişkili olduğu düşünülen Tip-2 diyabetin de kolorektal kanser açısından risk oluşturduğu ileri sürülmektedir (101).

2.3.1.10. Sigara:

Sigara içmenin akciğer kanserine neden olduğu bilinmektedir. Ancak, uzun süre sigara içen bireylerin sigara içmeyenlere göre kolorektal kansere yakalanma ve ölme risklerinin daha fazla olduğu öne sürülür. Sigaranın diğer bir çok kanser türünde yakalanma riskini arttırdığı bilinmektedir (101).

2.3.2. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI

En yaygın kalıtsal sendromlar adenomatöz polipler (FAP) ve HNPCC kolon kanseridir (102).

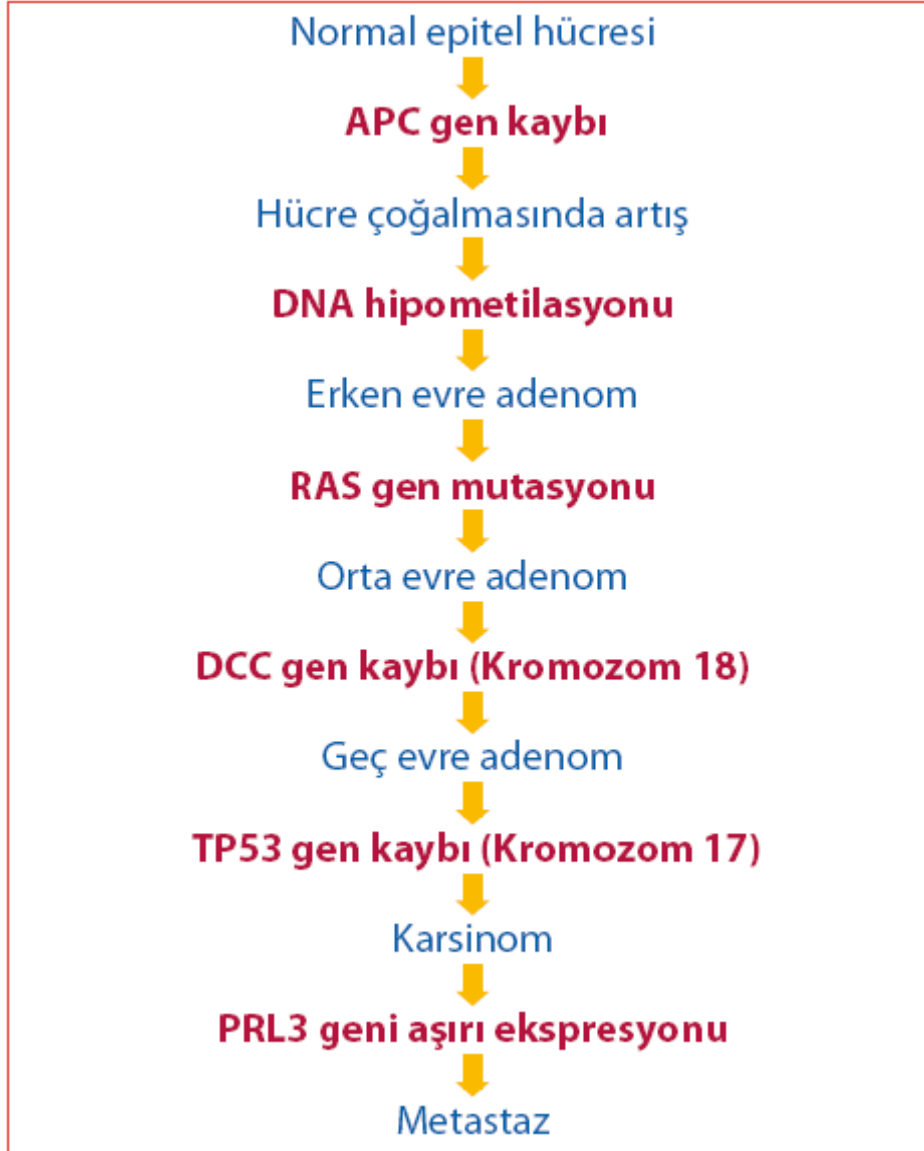
Ailesel adenomatöz poliplerde, beşinci kromozom üzerinde yer alan bir tümör supresör gen olan APC'de germline bir mutasyon söz konusudur(102). APC, wnt sinyal yolu, intrasellüler hücre adezyonu, iskelet stabilizasyonu, hücre döngüsü düzenlenmesi ve apoptozda önemli rol oynayan 312 kD'luk bir proteini kodlamaktadır. APC döngüsü mutasyonları, c-myc ve siklin D1 gibi onkogenlerin düzensiz transkripsiyonuna izin verdiği düşünülmektedir. Wnt sinyal yolağı kanser gelişiminde oldukça önemli mekanizmaları içermektedir (103).

HPNCC dominant kalıtım gösterir (104). Mis-match tamir (MMR) genlerinin üçündeki mutasyonlar, dominant kalıtılan HNPCC'ye neden olur. Bunlar, kromozom 2p üzerindeki MSH2, kromozom 3p üzerindeki MLH1 ve kromozom 2p16 üzerindeki MSH6 genleridir. MMR genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan kolorektal kanserli olgularda mikrosatellit instabilite ve replikasyon hata (RER-Replication Error) formlarının varlığı kendini göstermiştir. (105). Örneğin, TGBIIR, IGFIIIR ve bax genleri, HNPCC hastalarında sık sık değişen kod alanındaki kısa tekrarları taşır (106).

Genomik sekansların yaklaşık %20'si ortalaması kolorektal kanserde heterozigotluğun kaybedilmesine (LOH) uğrar. Bu durum tümör supressör genlerinin aktivasyonuna eşlik eden kromozomal dizilerinin kaybına neden olur. Allellik kayıplarına ek olarak, kanser hücresinde sitogenetik olarak gözlenen anöploidinin de temelini oluşturur (107).

Genel olarak, kolon kanserinin çok basamaklı genetik değişimler ve birikimlerle ortaya çıktığı kabul edilmektedir(108). Kolon karsinomlarının, onkogenler, tümör supressör genler ya da DNA tamir genlerindeki mutasyonların sonucu olarak geliştiği düşünülmektedir (109). Bu mutasyonlar, K-ras gibi onkogen veya APC, p53 ve DCC genleri gibi tümör supressör genlerdeki mutasyonlar olabilir (110). Çoğu kolon kanserlerindeki genetik değişimler adenomlarda mevcut olup, bunlar arasında, 5q kromozomu üzerindeki APC geni delesyonu, K-ras protoonkogeninin nokta mutasyonu, kolon kanser geninin (DCC) delesyona uğramış kaybı ve 17q kromozom üzerindeki p53 geninin delesyonu, ayrıca DNA replikasyon hataları, mikrosatellit düzensizliği

(mikrosatellit instabilite-MSI), her zaman bulunan somatik mutasyonlar, hMSH2, HLH1, PMS1, PMS2 ve GTBP'yi içeren nükleotit mismatch tamir genlerindeki mutasyonlar da bu grupta sayılabilir (111).



Şekil 6 : Kolon kanserinde moleküler düzeyde çok aşamalı gidiş (112).

Kolorektal karsinoma gelişiminden sorumlu genler arasında, p53 geninin inaktivasyonu, benign tümörden malign tümöre geçiş rolünü üstlendiği düşünülmektedir. Çünkü p53 geninin değişimi, kolorektal karsinomanın %49-70'inde

oluşmakta ve adenomda yoğun olarak bulunmaktadır (113). P53 tümör supressör geninin her iki allelindeki mutasyonlar sonucu, aktivitesinin kaybı söz konusudur (114).

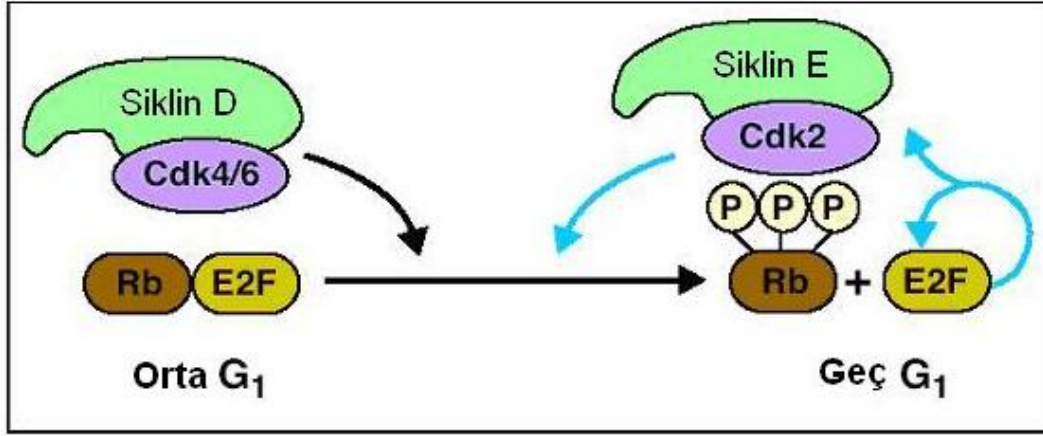
Kolorektal kanserlerde de hücre döngüsünde, DNA sentezi ve onarımında, tümör supressör genlerde, farklılaşma ve apoptozun kontrolünde meydana gelen birçok genetik değişim araştırılmaya devam etmektedir (115).

Kolorektal kanser açısından yaygın görüş arka plandaki genetik mutasyon oranlarının klonal yayılımlarla birleşerek kanser gelişimine neden olduğudur. Genetik karasızlığın tümör gelişimi için gerekli değil, ama yeterli olabileceği görüşü tartışılmaktadır (102).

2.4. P16 (CDKN2A, MTS-I, INK4a)

P16 önemli bir tümör baskılayıcı 156 amino asitlik bir protein olup kromozom 9p21 de lokalize, 3 ekzonlu bir gen tarafından kodlanmaktadır (116). INK4 grubuna bağlı siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p16, G1 fazından CDK4 ve CDK6'yı bağlayarak pRb'nin fosforlanmasını önler ve G1/S geçişini durdurur (117). P16'nın metilasyonu veya mutasyonu %1 dolaylarında bildirilmiştir (118,119). P16'nın promoter bölgelerindeki hipermetilasyonlar protein ekspresyonunda kayıp ile sonlanmaktadır (119,120). P16 inaktivasyonu, daha çok p53 mutasyonu bulunmayan hastalarda saptanmıştır ve homozigot delesyonu yüksek Ki-67 proliferatif indeks ile uyumlu bulunmuştur (121). P16 inaktivasyonu ile epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) geni amplifikasyonu beraberliği dikkat çekmiştir (122). Bu birliktelik daha yaşlı hastalarda ve daha kötü prognozla uyumlu bulunmuştur (119).

P16'da homozigot delesyon göstermeyen glioma hücreleri, CDK4'ün aşırı ekspresyonunu göstermişlerdir. p16, pRb ve CDK4 üyelerinden birinin değişikliği glial onkogeneizde rol oynamaktadır. p16 ekspresyon yokluğunda siklin D1-CDK4 kompleksi pRb'yi fosforlayarak E2F'nin serbest kalmasına ve hücrenin S fazına geçmesine neden olmaktadır. p16'nın ekspresyonu sırasında, pRb sıklıkla eksprese edilemezken, CDK4'ün aşırı ekspresyonu söz konusudur (123).



Şekil 7 : Retinoblastoma Proteini ve E2F Faktörü (7).

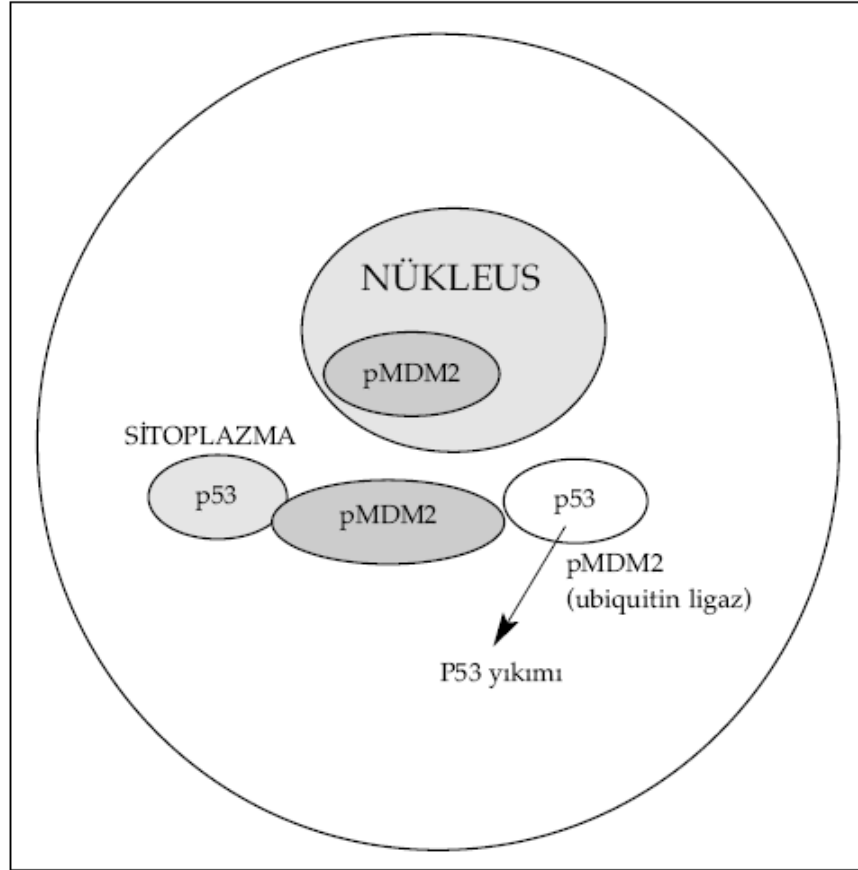
P16 inaktivasyonu hücre proliferasyonunu arttırmakta ve malignitenin gelişimine katkıda bulunmaktadır (124,125). P16'nın kodlanma ve 3'UTR bölgelerindeki polimorfizmlerin kanser gelişimi ve prognozu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bazı polimorfizmlerin p16'nın fonksiyonlarını değiştirdiği, bazılarının ise fonksiyonları üzerine etki etmediği gözlemlenmiştir (126,127).

2.5. MDM2 (Murine Double Minutes)

491 amino asitten oluşan, 56kDa moleküler ağırlığında olan P53 proteini, 17. kromozomda yer alan 11 ekzonlu bir gen tarafından kodlanmaktadır (128,129,130). Organizmada pek çok malignite durumu ile ilişkili olan p53, hipoksi, ultraviyole, radyasyon ve ilaç gibi nedenlerle hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda p21, p14 ARF, MDM2 ve bax genleri ile etkileşime girerek G1, G2 kontrol noktalarında döngünün durdurulması ve apoptoza neden olmaktadır (131).

MDM2 geni 12q13-14 kromozom bölgesinde yerleşmiştir (132). Buradan kodlanan MDM2 proteinin (pMDM2), p53'ü tutar ve p53'ün G1/S geçişinde siklusu durdurma ve apoptoz etkisini engeller (133). MDM2 proteini sitoplazmada p53'ü bağlanarak ve 'E3 ubiquitin ligase' aktivitesi ile p53'ü yıkarak p53'e karşı çalışan bir proteindir. Hipoksi, ultraviyole, radyasyon gibi hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda pMDM2'nin p53'e bağlanma yerinde asetilasyon ve fosforilasyon nedeni ile yapısal değişiklik oluşur. Bu yüzden MDM2 proteini p53'ü bağlayamaz ve serbest kalan p53 transkripsiyonel aktivitesini göstererek G1 ve G2 kontrol noktalarında

siklusun durdurulması ve bax geni aktivasyonu ile apoptoza neden olur. Ancak özellikle onkojenik stimölüs varlığında pMDM2 etkisini, p53'e bağımlı olmayan yolla gösterir. G1/S geçişinden sorumlu olan E2F/DP1 aktivasyonunu p14ARF'nin inaktivasyonunu yapar. İnaktive olan p14ARF hücre çekirdeğinde pMDM2'yi bağlayamaz ve sitoplazmaya çıkmasına engel olamaz. Bu nedenle p53'ün etkisi azalır. Ayrıca E2F aktivasyonu yaptığından hücre G1 fazından S fazına geçer (133,134).



Şekil 8 : Fizyolojik şartlarda p53 proteinin MDM2 proteini tarafından etkisizleştirilmesi (133).

MDM2 geninin birinci intronunun 309.nükleotidinde meydana gelen T-G baz değişiminin MDM2, RNA ve protein düzeylerinin artışına sebep olduğu ve sonrasında p53 yolağının baskılandığı bildirilmiştir (135). Fonksiyonlarına normal şekilde devam eden hücrelerde p53 proteini, düşük yoğunlukta ve kısa yarı ömre sahip olarak bulunmaktadır. Bu durum p53 proteinin düzenleyicisi olan MDM2 proteini ile sağlanır. MDM2 proteini, bu regülasyonu p53 proteinin amino ucuna bağladıktan sonra, hem p53 proteinin transkripsiyel etkinliğini baskılayarak, hem de proteozom aracılığıyla

parçalanmasını sağlayarak gerçekleştirir (136). Sporadik yumuşak doku sarkomlarının yaklaşık %20'sinde p53 mutasyonları ve p53, MDM2 proteinlerinin aşırı ekspresyonlarının sonucu olarak hayatta kalma süresinin azalmakta olduğu rapor edilmiştir (137,138).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI

Bu çalışmada üç örnek grubu kullanılmıştır. Birinci grupta, 75 kişiden oluşan herhangi bir malignite bulgusu ve tercihen ailede kanser hikayesi olmayan sağlıklı bireyler kontrol grubuna alınmıştır.

İkinci grupta, İ.Ü. Radyasyon Onkolojisi, Samatya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Cerrahi Kliniği tarafından takip edilen 35 mide kanserli hasta yer almaktadır. Üçüncü grupta ise, yine İ.Ü. Radyasyon Onkolojisi, Samatya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Cerrahi Kliniği tarafından takip edilen 87 kolorektal kanserli hasta yer almaktadır. Projemize dahil edilen, mide veya kolorektal kanser tanısı konmuş hastalarımızın, klinik, histopatolojik değerlendirmeleri ve örnek alımları ilgili klinikler tarafından gerçekleştirilmiştir. Polimorfizm çalışması için sağlıklı ve mide veya kolorektal kanserli bireylerin kan örnekleri EDTA'lı tüpe alınıp, DNA izolasyonu yapılmış ve 35 mide kanserli hasta, 87 kolorektal kanserli hasta, ve 75 sağlıklı kontrolde p16 (540C→G ve 580C→T) , MDM2 (SNP309 (T>G)) gen polimorfizm analizleri yapılmıştır.

Mide kanserli, kolorektal kanserli ve normal bireylerden sağlanan kan örneklerinden DNA izolasyonu amonyum asetat ve proteinaz K'nın kullanıldığı tuz çöktürme metoduyla elde edilmiştir (139).

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Agaroz (Promega MBG), Amonyum asetat (Sigma A-8920), Amonyum klorür (Sigma A-5666), Amonyum sülfat, Asetik asit (MECK K-04134156), Borik asit (Sigma B-6768), Bromfenol blue (Sigma B-6896), DNA marker (Fermentas), EDTA (Merck K-90602121), Etanol (%99 Tekel), Etidyum Bromid (Sigma E-8751), Hidroklorik asit (% 37 Merck K-13190114), İzopropanol, Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552), Potasyum hidroksit (Sigma P 1767) Primerler (Fermentas), Proteinaz K (Stratagene 300-141) Sodyum dodesil (lauryl) sülfat (Sigma L-5750), Sodyum hidroksit (Merck C754962), Sodyum klorür (Carlo Erba 368257), Trizma baz (Sigma T-1503), Taqpolimeraz (Promega), Xylene blue (Fermentas).

3.3. KULLANILAN GEREÇLER

Elektroforez için güç kaynağı (Titan plus Helena Laboratories), Elektroforez sistemi (LKB 2013 miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxiphor electrophoresis), Hassas terazi (Mettler), Isıticılı manyetik karıştırıcı (Elektromag), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifüj (TDX), PZR cihazı (MJ Research Techne), pHmetre (Hanna), Pipet takımı (Brand), Santrifüj (Hereaus), Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208), Su banyosu (Elektromag), UV transilluminator (Stratagene UV/White light Transilluminator), Vorteks karıştırıcı (Nuve mix), nanodrop (ND-1000 spectrophotometer).

3.4. ÇÖZELTİLER

3.4.1. DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.4.1.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer)

8.74 gram Amonyum klorür, 1 gram Potasyum bikarbonat, 200 µl 0.5 M Etilen diaminetetraasetat (EDTA)'ın tartımları yapılarak erlen içine alındı. 900 mililitre distile su eklendi ve çözeltinin pH'sı 1N NaOH ile 7.4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak 1 litreye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktararak 120°C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

3.4.1.2. 0.5 M Disodyumetilendiamintetraasetat (EDTA) (pH 8.0)

186.1 gram Etilendiamintetraasetat (EDTA) tartılarak beher içine alındı ve 800 ml distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü ve pH'sı NaOH çözeltisi ile 8.0'e ayarlanarak distile su ile 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.3. 4 M Sodyum Klorür (NaCl)

233.6 gram NaCl tartılarak erlene alındı. Üzerine 800 mililitre distile su ilave edildi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı. 120°C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL)

25 mililitre 4 M NaCl ve 50 mililitre 0.5 M Etilendiaminasetat (EDTA) balon jojeye konularak 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

3.4.1.5. 1 M Tris Tamponu (Stok)

121.1 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 42 µl hidroklorik asit (HCl) ile yaklaşık 800 mililitre distile su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü. Daha sonra balon jojeye aktarıldı ve 1 litreye tamamlandı. 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.6. 9.5 M Amonyum Asetat

73.22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alındı. Üzerine 80 mililitre distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktarıldı ve distile su ile 100 mililitreye tamamlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve +4°C’de saklandı.

3.4.1.7. %10’luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

10 gram Sodyum dodesil sülfat tartıldı. Beher içine alınarak üzerine 80 mililitre distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürüldü ve pH’sı 7.2’ye ayarlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.4.1.8. Proteinaz K (20 mg/ml)

20 miligram Proteinaz K tartılarak steril bir tüp içinde steril distile su ile 1 mililitreye tamamlandı. -20 °C’de saklandı.

3.4.2. AGARÖZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.4.2.1. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X)

20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS, 0.2 mililitre 0.5 M ,etilendiamintetraasetat, 1 mililitre 1M Tris (pH 8.0), 200 miligram Bromfenol blue, 200 miligram xylene cyanol tartılarak steril distile su ile 100 mililitreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

3.4.2.2. Etidyum Bromür (10 mg/ml)

1 gram Etidyum bromür tartılarak steril distile su ile 10 mililitreye tamamlandı.

3.4.2.3. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE)

54 gram Tris baz ve 27,5 gram borik asit tartılarak beher içine aktarıldı. Üzerine 20 mililitre 0.5 M EDTA (pH 8.0) ve 800 ml. distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü.Çözelti balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı ve 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.5.1. PERİFERİK KANDAN DNA İZOLASYONU

10 ml periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındıktan sonra çalışma için falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:3 oranında (30 ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve +4°C'de 15 dakika bekletildi. +4°C'den çıkarılan örneklerin 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları atıldı ve pelletleri tamamen süspanse edilerek üzerlerine tekrar 15-20 ml. eritrosit parçalama çözeltisi eklendi. Örnekler +4°C'de 15 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atılarak süspanse edildi. Süspanse olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS, 75 µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9.4 ml lökosit parçalama çözeltisi (WBL) eklenerek 56 °C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. Inkübasyon sonrası her 1 ml. örnek başına 0.37 ml. olacak şekilde 9.5 M Amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra yavaşça karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü (139).

3.5.1.1. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini

Spektrofotometrik olarak, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. 50µg/ml çift iplikçikli DNA içeriğinin 260 nm dalga boyunda 1 optik densite (OD) verdiği kabul edilmektedir. 260 nm'deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

DNA Konsantrasyonu: $OD_{260} \times 50\mu\text{g/ml}$

DNA örneklerinin saflığı OD_{260}/OD_{280} oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD_{260}/OD_{280} değeri yaklaşık 1.8'dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1.8'den küçük olacaktır. OD_{260}/OD_{280} değeri 2'den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelir.

3.5.2. p16 GEN POLİMORFİZMLERİNİN TESPİT EDİLMESİ

3.5.2.1. p16 540C→G ve 580C→T Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri

p16 ilgili gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler uluslararası yayınlarda doğrulanmış primer dizileridir (140).

İleri primer: 5'- GAT GTG CCA CAC ATC TTT GAC CT- 3'

Geri primer: 5'- CTA CGA AAG CGG GGT GGG TTG T -3'

3.5.3. MDM2 GEN POLİMORFİZMLERİNİN TESPİT EDİLMESİ

3.5.3.1. MDM2 SNP309 (T>G) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri

MDM2 ilgili gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler uluslararası yayınlarda doğrulanmış primer dizileridir (141).

İleri primer: 5'- CGC GGG AGT TCA GGG TAA AG-3';

Geri primer: 5'- AGC TGG AGA CAA GTC AGG ACT TAA C -3'

3.5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PZR)'da Kullanılan Kimyasal Maddeler ve PZR'ın Hazırlanışı

DNA Taq polimeraz enzimi (5U/μl) (Fermentas EPO402)

PZR reaksiyonundaki son konsantrasyonu 1 unite olacak şekilde 25 μl lik PZR reaksiyonuna eklendi.

dNTP'ler (100 μmol/ml) (Fermentas R0171)

100 mM'lık dNTP'lerden (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10' ar μl alınıp (toplam 40 μl) 1 μl'lik tüpe kondu ve üzerine 960 μl distile su eklenerek (d₂H₂O) 1000 μl 1mM 'lık dNTP karışımı hazırlandı ve -20 °C derin dondurucuda saklandı. PZR reaksiyonuna bu stoktan alınan dNTP karışımı kullanıldı.

3.5.4.1. PZR Karışımının Hazırlanışı

Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde, Tablo3.1'deki bileşenler sırası ile 0,2 ml'lik steril tüpe konuldu. 10 örnek çalışılacak ise pozitif ve negatif kontrol için birer tane ve pipetleme hataları için de bir tane olmak üzere toplam 13 üzerinden reaksiyon karışımı hazırlandı.PZR karışımının hazırlanma işlemlerinin hepsi buz üzerinde soğukta ve steril kabin içerisinde yapıldı.

Tablo 1 : PZR karışımının hazırlanması

Malzemeler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	Kullanılan hacim	10 + 3' lük Reaksiyon
PZR Tamponu	10 X	1X	3 µl	39µl
dNTP	1mM	200 µM	3 µl	39µl
İleri primer	100pmol/µl	4 pmol/µl	1.2µl	15.6 µl
Geri primer	100pmol/µl	4 pmol/µl	1.2 µl	15.6 µl
MgCl ₂	25 mM	-	1,2 µl	15.6µl
Taq polimeraz	5U/ µl	1 U	0,5 µl	6.5 µl
Distile su	-	-	12.9Sµl	167.7µl
DNA	-	150-200 ng.	2 µl	-

Taq polimeraz eklendikten sonra hiç vakit kaybetmeden tüp içine konan bileşenlerin iyice karışması için pipetleme işlemi yapıldı. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 23 µl reaksiyon karışımı dağıtıldı. Daha sonra her tüpe 2 µl DNA eklenerek yeniden pipetleme yapıldı ve daha önceden 95 °C sıcaklığa çıkarılmış PZR cihazına(Techne Mini Termal Cycler)örnekler yerleştirildi ve PZR işlemi başlatıldı.

3.5.5. PZR Şartları

p16, 540C→G ve 580C→T Gen Polimorfizmlerini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 56 °C sıcaklık kullanıldı (140) (Tablo 3.2).

MDM2, SNP309 G→T Gen Polimorfizmini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 56 °C sıcaklık kullanıldı (141) (Tablo 3.3).

Tablo 2 : p16, 540C→G ve 580 C→T Gen Polimorfizmleri PZR Koşulları

95 °C	5 dakika
95 °C 56°C 72°C	30 saniye 45 saniye 30 saniye
	35 döngü
72°C	5 dakika

Tablo 3 : MDM2, SNP309 (G>T) Gen Polimorfizmi PZR Koşulları

95 °C	5 dakika
95 °C 56 °C 72°C	30 saniye 45 saniye 30 saniye
	35 döngü
72°C	5 dakika

3.5.6. AGARÖZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE GEREÇLER

5X TBE (Tris Buffer EDTA) Stok Tampon Hazırlanışı :

54gr Tris base (Sigma, T-8524) ve 27,5 gr. Borik asit (Sigma, B-6768) tartılarak 800 ml distile suda çözüldü.Üzerine 20 ml 0,5 M EDTA (pH :8,0) ilave edildikten sonra

1000 ml'ye tamamlandı. Elektforezde stok 5X TBE tamponundan hazırlanan 1 X TBE kullanıldı.

Yükleme Tamponu (Loading Buffer : 6X)

Yükleme tamponu (loading buffer) olarak %40 süktroz + %0,25 bromfenol mavisi karışımı kullanıldı.

%2'lik Agaroj Jel Hazırlanması:

- 4 gr. agaroz (Sigma) tartılarak erlen içine konuldu. Üzerine son hacim 200 ml. olacak şekilde 1X TBE tamponu eklenerek, mikrodalga fırında kaynatma yolu ile çözündürüldü.
- Erlenin sıcaklığı elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde (50-55°C) çözünmüş agaroz jel içine 4,5 µl etidyum bromür (10mg/ml) ilave edildi.
- Hazırlanan jel yatay jel yatağı içine dökülerek, yüklem kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilerek donmaya bırakıldı.
- Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel örnek yüklenmesi için hazır duruma geldi.

3.5.6.1. PZR Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi:

- %2'lik jel hazırlandıktan sonra 1X TBE tamponu içeren jel tankı içine uygun şekilde konuldu.
- Agaroj jelin üzerini 2-3 ml gelecek şekilde 1X TBE tamponu jel üzerine eklendi.
- 7 µl PZR ürününe, 3 µl yüklem tamponu (6X) eklenip pipetleme yapılarak karıştırıldı. 10 µl'lik örnek karışımı kuyucuklara sırasıyla yüklendi.

Yüklem işleminden sonra jel tankının kapağı kapatıldı. Güç kaynağı (E-C apparatus Corporation, E-C4000P) 250 miliamper 120 volt elektrik gücüne ayarlanarak elektforez jel yürütülmesi gerçekleştirildi.

3.5.6.2. PZR Ürünlerinin Kontrolü:

P16 ve MDM2 ilgili gen bölgeleri ile ilgili PZR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla PZR tüplerinden alınan 7 µl örnek 3 µl yüklem tamponu ile karıştırılarak yukarıda tanımlanan elektforez sisteminde yürütüldü. Yürütme

işleminde sonra jel UV ışık altında (304 nm dalga boyunda) PZR ürünleri incelendi ve fotoğrafı UV transillüminator düzeneğinde çekildi.

3.5.7. p16 GEN POLİMORFİZMLERİNDE ENZİM KESİMİ

3.5.7.1. p16 (540C→G) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler

Amplifiye olan PZR ürünleri MspI enzimi 37°C’de 16 saat kesilmiştir. Kesim işleminde bir örnek için 10 µl PZR amplifikasyon ürünü, 7,5 µl distile su, 2µl 10x buffer kullanılmıştır.

Tablo 4 : p16 (540C→G) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler

Malzemeler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	Eklenen hacim
PZR ürünü			10 µl
Distile su			7,5µl
10X Buffer R Tamponu	10 X	0,8 X	2µl
MspI enzimi	10 U/µl	5 U/µl	0,5 µl

Toplam :20 µl

3.5.7.2. p16 (580C→T) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler

Amplifiye olan PZR ürünleri HaeIII enzimi 37°C’de 16 saat kesilmiştir. Kesim işleminde bir örnek için 10 µl PZR amplifikasyon ürünü, 7,5 ul distile su,2 µl 10x buffer kullanılmıştır.

Tablo 5 : p16 (580C→T) Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler

Malzemeler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	Eklenen hacim
PZR ürünü			10 µl
Distile su			7,5µl
10X Buffer R Tamponu	10 X	0,8 X	2µl
HaeIII enzimi	10 U/µl	5 U/µl	0,5 µl

Toplam :20 µl

3.5.7.3. MDM2 SNP309 (T>G) Gen Polimorfizmi Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler

Amplifiye olan PZR ürünleri MSPA1I enzimi ile 37°C’de 16 saat kesilmiştir. Kesim işleminde bir örnek için 10 µl PZR amplifikasyon ürünü, 7,5 ul distile su, 2 µl 10x buffer kullanılmıştır.

Tablo 6 : MDM2 SNP309 (T>G) Gen Polimorfizmi Tespitinde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler

Malzemeler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	Eklenen hacim
PZR ürünü			10 µl
Distile su			7,5µl
10X Buffer R Tamponu	10 X	0,8 X	2µl
MSPA1I enzimi	10 U/µl	5 U/µl	0,5 µl

Toplam :20 µl

3.5.8. p16 540C→G, 580C→T ve MDM2 SNP309 (T>G) Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü

- %2lik agaroz jel hazırlandı.
- İlgili kesim enzimleri ile kesilen PZR ürünlerinden 8 µl ve yükleme tamponundan 2 µl alınarak karıştırılıp %2'lik agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı.
- Kesim ürünleri (Fermentas PUC 19, 50 bp marker veya 100 bp marker) DNA moleküler marker ile birlikte yürütüldü.
- Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, UV ışık (304 nm) altında incelendi.

3.5.8.1. p16 540C→G Gen Polimorfizminin Değerlendirilmesi

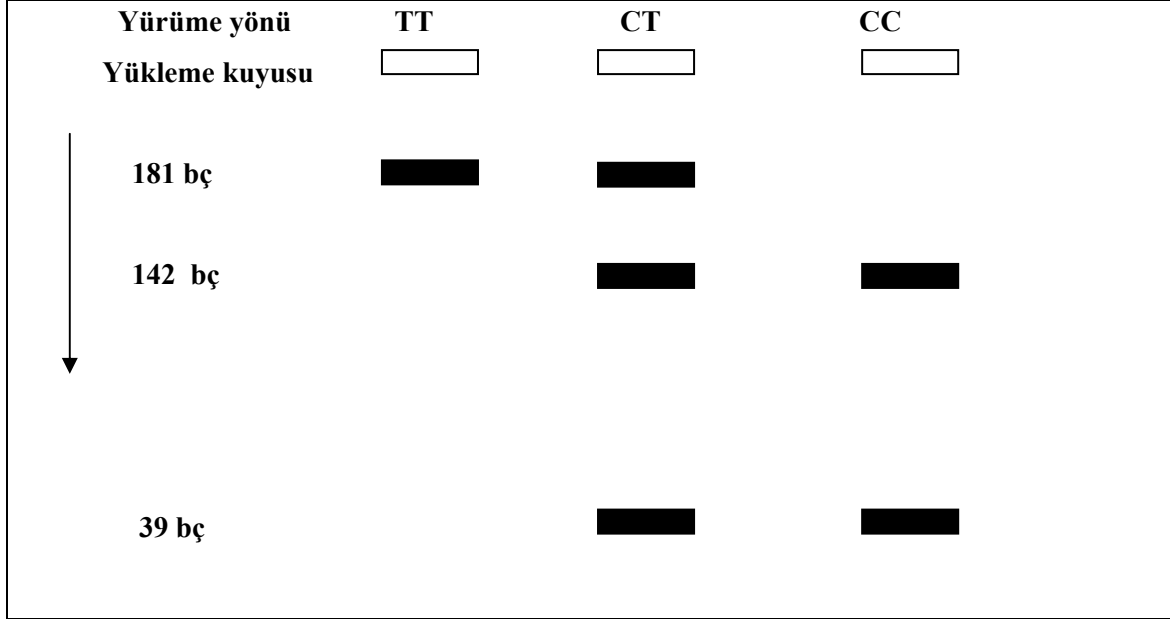
Uygun koşullar altında MSPI enzim ile kesilen PZR ürünlerinden G alleleline sahip örnekler 181 bç büyüklüğünde tek bant verirken, homozigot C alleleline sahip mutasyon içermeyen PZR ürünleri, enzim kesimi sonrası 104 bç ve 77 bç olmak üzere iki bant vermektedir. Heterozigot yani GC genotipine sahip mutasyonlu PZR ürünleri ise 181, 104 ve 77 bç olmak üzere her üç bandı da içermektedir (Şekil 9).

Yürüme yönü	GG	GC	CC
Yükleme kuyusu			
181 bç			
104 bç			
77 bç			

Şekil 9 : p16 540C→G Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü

3.5.8.2. p16 580C→T Gen Polimorfiziminin Değerlendirilmesi

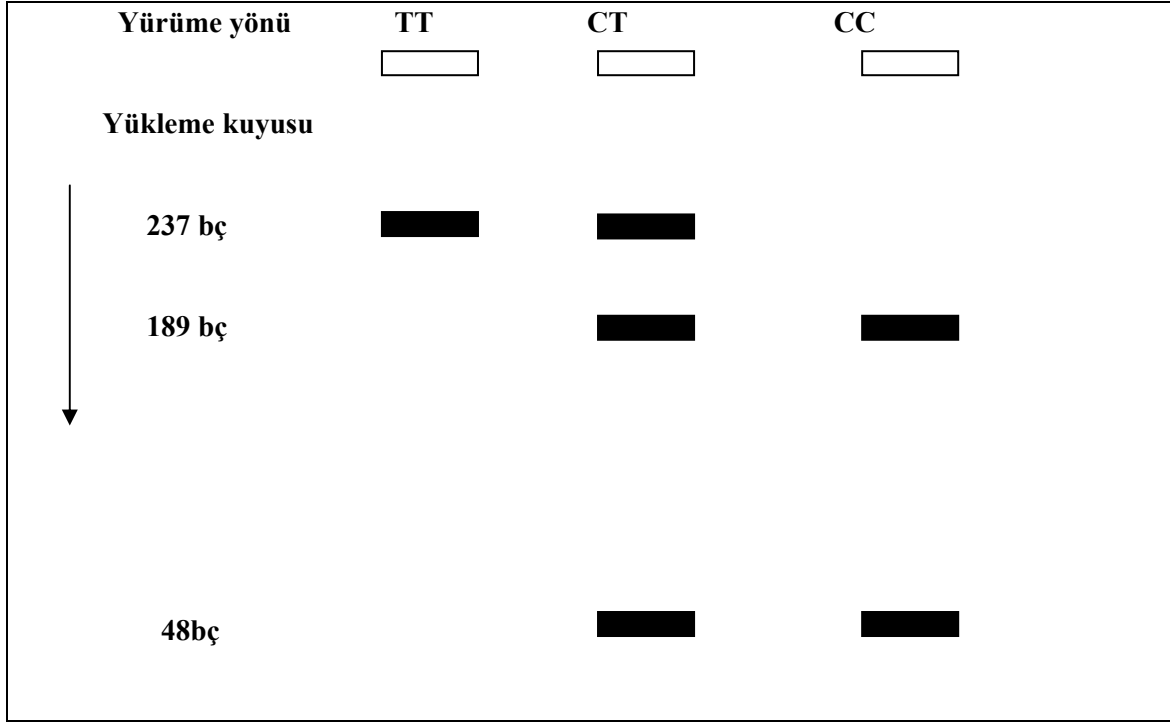
Uygun koşullar altında HaeIII enzimi ile kesilen PZR ürünlerinden T alleleline sahip örnekler 181 bç büyüklüğünde tek bant verirken, homozigot C alleleline sahip mutasyon içermeyen PZR ürünleri, enzim kesimi sonrası 142 ve 39 bç olmak üzere iki bant verir. Heterozigot yani CT genotipine sahip mutasyonlu PZR ürünleri ise 181, 142 ve 39 bç olmak üzere her üç bandı da içerir (Şekil 10).



Şekil 10 : p16 580 C→T Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü

3.5.8.3. MDM2 SNP309 (T>G) Gen Polimorfiziminin Değerlendirilmesi

Uygun koşullar altında MSPA1I enzimi ile kesilen PZR ürünlerinden mutasyon içeren T alleleline sahip örnekler 237 bç büyüklüğünde tek bant verirken, homozigot G alleleline sahip mutasyon içermeyen PZR ürünleri enzim kesimi sonrası 189 ve 48 bç olmak üzere iki bant verir. Heterozigot yani GT genotipine sahip mutasyonlu PZR ürünleri ise 237, 189 ve 48 bç olmak üzere her üç bandı da içerir (Şekil 11).



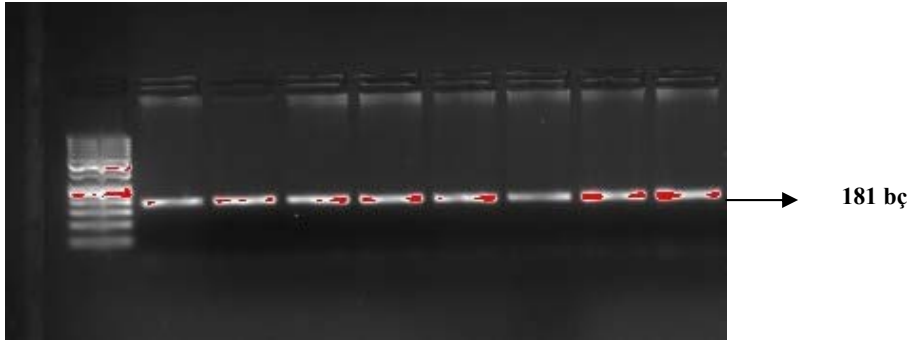
Şekil 11 : MDM2 SNP309 (T>G) Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü

4. BULGULAR

4.1. PZR ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR

4.1.1. p16 540C→G ve 580C→T PZR Ürünlerine Ait Bulgular

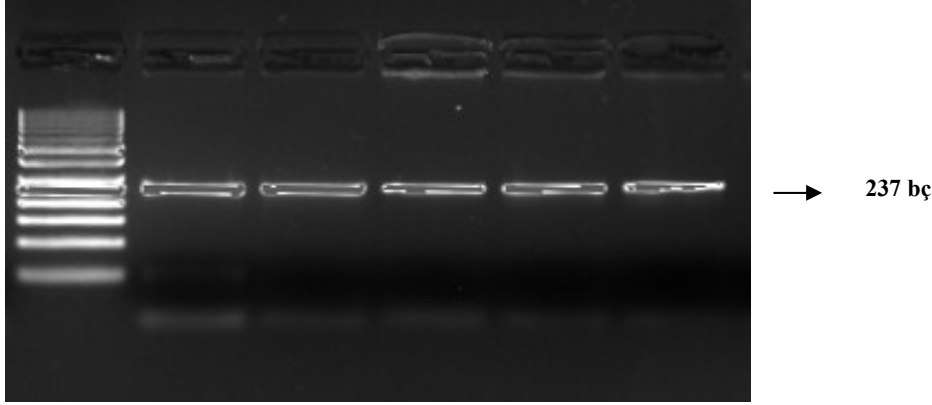
p16 gen bölgesinin polimorfizmine ait PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde P16 540C→G ve 580C→T polimorfizminin tespiti için 181 bç'lik (Şekil 12) özgül PZR ürününe ait bantlar elde edildi. Bu bantlar gözlemlendikten sonra p16 540C→G bandının MSPI, p16 580C→T bandının ise HaeIII enzimi ile kesimi gerçekleştirildi.



Şekil 12 : p16 540 C→G ve 580 C→T PZR ürünlerinin %2'lik jeldeki görüntüsü (50 bç markır)

4.1.2. MDM2 SNP309 (T>G) PZR Ürünlerine Ait Bulgular

MDM2 SNP309 (T>G) gen bölgesinin polimorfizmine ait PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde MDM2 SNP309 (T>G) polimorfizminin tespiti için 237 bç'lik (Şekil 13) özgül PZR ürününe ait bantlar elde edildiği gözlemlendikten sonra 237 bç'lik MDM2 SNP309 (T>G) bandının MSPA1I enzimi ile kesimi gerçekleştirildi.

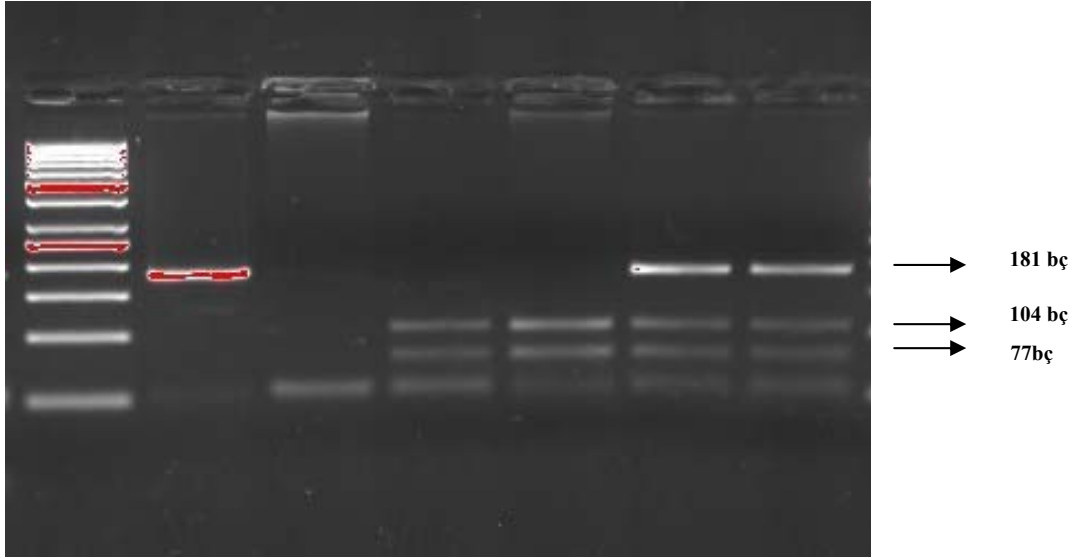


Şekil 13 : MDM2 SNP309 (T>G) PZR ürünlerinin %2'lik jeldeki görüntüsü (50 bç markır)

4.2. KESİM ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR

4.2.1. p16 540C→G ve 580C→T Kesim Ürünlerine Ait Bulgular

p16 540C→G ve 580C→T PZR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenip kontrol edildikten sonra, p16 540C→G PZR ürünlerine MspI ve p16 580C→T PZR ürünlerine HaeIII enzimiyle kesim uygulandı. Kesim sonrası elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel elektroforez yöntemiyle yürütüldü. p16 540C→G polimorfizminde MspI enzimi ile kesilmeden kalan 181 bç'lik tek banda sahip örnekler (GG) homozigot mutant olarak, MspI enzim kesimi olan ve agaroz jel elektroforezde 104 bç ve 77 bç'lik iki bant veren örneklerde homozigot doğal (wild) tip olarak (CC) şeklinde değerlendirilirken , 181 bç, 104bç ve 77 bç olmak üzere üç bant veren örnekler ise heterozigot mutant (GC) olarak değerlendirildi (Şekil 14). p16 580C→T polimorfizminde HaeIII enzimi ile kesilmeden kalan 181 bç'lik tek band veren örnekler homozigot mutant (TT) olarak değerlendirilirken, HaeIII enzim kesimi gerçekleşen ve agaroz jel elektroforezde 142 bç ve 39 bç'lik iki bant veren örneklerde doğal- (wild) tip homozigot (CC) , 181 bç, 142bç ve 39 bç olmak üzere üç bant veren örnekler ise heterozigot mutant (CT) olarak değerlendirildi (Şekil 15).



Şekil 14 : p16 540C→G Kesim Ürünlerine Ait Bulgular (50 bç markır)

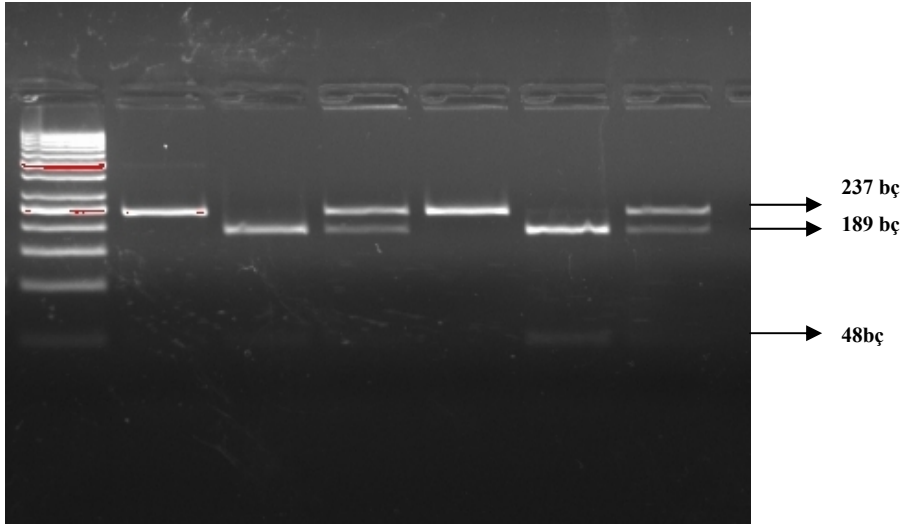


Şekil 15 : p16 580 C→T Kesim Ürünlerine Ait Bulgular (50 bç markır)

4.2.2. MDM2 SNP309 (T>G) Kesim Ürünlerine Ait Bulgular

MDM2 SNP309 (T>G) PZR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenip kontrol edildi. MDM2 SNP309 (T>G) PZR ürünlerine MSPA1I enzimiyle kesim uygulandı. Kesim sonrası elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel elektroforez yöntemiyle yürütüldü. MDM2 SNP309 (T>G) polimorfizminde MSPA1I enzimi ile kesilmeden kalan 237 bç'lik tek band veren örnekler homozigot mutant (TT) olarak, MSPA1I enzim kesimi gerçekleşen ve agaroz jel elektroforezde 189bç ve 48 bç'lik iki band veren örneklerde doğal (wild) tip homozigot (GG) şeklinde değerlendirilirken , 237 bç, 189 bç ve 48 bç

olmak üzere üç bant veren örnekler ise heterozigot mutant (GT) olarak değerlendirildi (Şekil 16).



Şekil 16 : MDM2 SNP309 (T>G) Kesim Ürünlerine Ait Bulgular (50bç markır)

Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Hesaplar

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 7,5 paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alınmış olup P16 (540C→G, 580C→T) , MDM2 SNP309 (T>G) genotip ile allellerinin görülme sıklığının, gruplar arası farklılıklarla beraber değerlendirilmesinde Ki kare (χ^2), sayısal verilerin analizi için ise student-t testi kullanılmıştır.

4.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONRASINDA ELDE EDİLEN BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen kolorektal ve mide kanserli hasta ve kontrol grubuna ait özellikler Tablo 4.1’de verilmiştir. Buna göre kolorektal kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında cins, yaş, kilo, boy, VKI, ailede kanser hikayesi, alkol kullanımı ve sigara kullanımı parametreleri açısından istatistiksel anlamlılık mevcut değildi ($p=0,052$; $0,173$; $0,95$; $0,40$; $0,730$; $0,067$; $0,663$; $0,789$). Aynı durum mide kanserli hastalar ve kontrol grubu arasında da geçerli olup, parametreler arasında istatistiksel açıdan anlamlılık bulunamadı ($p=0,013$; $0,754$; $0,907$; $0,965$; $0,155$; $0,103$; $0,258$; $1,000$).

Tablo 7 : Çalışma gruplarına ait veriler

	KONTROL n= 75	KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALAR n= 87	MİDE KANSERLİ HASTALAR n=35
Cins			
Kadın, n (%)	39(52)	32(36,8)	9(25,7)
Erkek, n(%)	36(48)	55(63,2)	26(74,3)
Yaş Ortalamaları (yıl)	54,42±2,37	58,34 ±1,59	60,40±2,67
Kilo (kg)	74,19±2,17	74,4±2,34	63,80±3,04
Boy (m)	1,69±0,015	1,67±0,017	1,69±0,025
VKI (kg/m2)	25,99± 0,91	25,42±1,30	22,13±0,74
Ailede Kanser Hikayesi			
Pozitif, sayı(%)	9(12)	3(3,4)	0(0)
Negatif, sayı (%)	66(88)	84(96,6)	21(100)
Alkol Kullanımı			
Pozitif, sayı(%)	3(4)	2(2,3)	1(20)
Negatif, sayı(%)	72(96)	85(97,7)	4(80)
Sigara Kullanımı			
İçenler, sayı (%)	6(8)	6(6,9)	1(10,8)
İçmeyenler , sayı (%)	69(92)	81(93,1)	7(87,5)

n:birey sayısı; tablodaki değerler $\bar{X} \pm SE$ olarak verilmiştir; gruplararası analiz student t testi ve Kikare (χ^2) ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışma grubumuza dahil edilmiş olan kolorektal kanserli hastaların %63,2'si erkek, %36,8'i kadınlardan oluşmaktaydı. Kolorektal kanserli erkek hastaların kilo ve boy parametrelerinin kadın hastalara göre yüksek olduğu saptanmıştır. Ancak VKI değerleri açısından incelendiklerinde erkek hastalar (24,75±1,72) ve kadın hastalar (26,82±1,85) arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmedi (p=0,471). Hasta grubu boy, kilo ve VKI parametreleri açısından değerlendirildiğinde erkek hastaların boy ve kilo (1,71±0,014; 79,29±1,92) parametrelerinin kadın hastalara (1,60±0,030; 64±4,22) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenirken (p=0,002; p=0,001) VKI parametreleri arasında erkek ve kadın cinsiyeti açısından bir fark saptanmamıştır. Yaş parametreleri açısından incelendiğinde, erkeklerin yaşı 57,84±1,94 iken, kadınların yaşı 59,16±2,78 şeklinde olup p değeri 0,693 bulunmuştur. Hastaların

%5,7'sinde tümör T1 evresinde, %12,6'sında T2, %63,2'sinde T3 ve %18,4'ünde T4 evresindeydi. Tümör lokalizasyonu, %12,6'sında sol kolon, %16,1'inde sağ kolon, %5,7'sinde çekum, % 6,9'ünde transvers kolon, %36,8'inde sigmoid, %21,8'inde ise rektumda yer almaktaydı. Hastalar lenf nodu tutulumu açısından incelendiğinde, N0 %49,4, N1 %27,6, N2 %16,1, N3 %6,9 olarak değerlendirilmiştir. Kolorektal kanserli hastalar histolojik evrelendirmeye göre değerlendirildiğinde, % 10,3'ü iyi differansiye, % 69'u orta differansiye, %20,7'si ise az differansiye tümörlerdi. Hastaların, %20,7'sinde uzak metastaz, %44,8'inde anjiyolenfatik invazyon, % 35,6'sinde perinöral invazyon varlığı söz konusuydu.

Çalışmamızdaki mide kanserli hastaların %74,3'ü erkek, % 25,7'si kadınlardan oluşmaktaydı. Mide kanserli erkek hastaların ($66,86 \pm 2,87$; $1,73 \pm 0,016$) kilo ve boy parametreleri kadın hastalara ($56,67 \pm 6,66$; $1,61 \pm 0,058$) göre daha yüksek olmasına rağmen aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,319$; $0,130$). VKI parametresi açısından incelendiğinde kadın ($21,61 \pm 1,19$) ve erkek ($22,36 \pm 0,98$) cinsiyeti açısından bir fark saptanmamıştır ($p=0,429$). Yaş parametresine göre ise erkeklerin yaşı $60,85 \pm 2,92$ iken, kadınların yaşı $59,14 \pm 6,46$ şeklinde olup $p=0,732$ bulunmuştur. Mide kanserli hastaların tümör evreleri incelendiğinde, %52,4'ü T2, %19'u T3, %28,6'sı T4 olarak saptandı. Hastalar lenf nodu tutulumu açısından incelendiğinde, N0 %28,6, N1 %23,8, N2 %28,6, N3 %19 olarak değerlendirildi. Hastaların %28,6'sında uzak metastaz, %52,4'ünde anjiyolenfatik invazyon, %41,2'sinde tümör nekrozu, %50'sinde kan damarı invazyonu varlığı durumu saptandı. Hastalar histolojik evrelendirmeye göre değerlendirildiğinde, % 4,8'i iyi differansiye, % 42,9'u orta differansiye, %50,4'ü ise az differansiye tümörlerdi. Tümör lokalizasyonu, %11,1'inde antrum büyük kurvartür, %22,2'sinde antrum küçük kurvartür, %11,1'inde kardial, %27,8'sinde antrum korpus, %11'inde antrum pilor ve %16,7'sinde ise antrum yer almaktaydı. Tümör tipleri, %15,4'ünde tübüler, %23,1'inde intestinal, %46,2'sinde diffüz taşlı yüzük ve %15,4'ünde müsinöz adeno ca şeklindeydi.

Tablo 8 : Mide kanserli hastalarda p16 540C→G ve 580C→T gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel dağılımları

Genotipler ve Alleller	Mide Kanserli Hastalar n(%)	Kontroller n(%)	OR: %95 Güven Aralığı (CI)	P
P16 540C→G				
GG	0(0)	13(17,3)		P=0,009
GC	11(31,4)	36(48)	0,655(0,380-1,127)	P=0,102
CC	24(68,6)	26(34,7)	1,978(1,348-2,902)	p<0,0001
C Alleli	59(84,29)	88(58,7)		P=0,0001
G Alleli	11(15,71)	62(41,3)		
P16 580C→T				
TT	0(0)	3(4)	1,149(0,266-4,973)	p>0,05
CT	6(17,1)	18(24)	0,910(0,517-1,602)	p>0,05
CC	29(82,9)	54(72)	1,022(0,846-1,234)	p>0,05
T Alleli	6(8,57)	24(16)		p>0,05
C Alleli	64(91,43)	126(84)		

N: birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

Tabloda seçilen genotipin, diğer tüm genotiplere karşı OR'si verilmiştir.

CDKN2A p16 540C→G gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde, genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve mide kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($\chi^2=13,635$; $p<0,001$). p16 540C→G gen polimorfizminde GG ve GC genotipleri mide kanserli hastalarda (%31,4), kontrol grubuna göre düşük frekansta gözlenmiş (%65,3) olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir ($\chi^2=11,064$; $p<0,001$, OR:0,481, %95CI: 0,287-0,806). CC genotipi mide kanserli hastalarda (%68,6), kontrol grubuna göre yüksek frekansta gözlenmiş (%34,7) olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmıştır ($\chi^2=11,064$; $p<0,001$, OR:1,978, %95CI: 1,348-2,902). GG genotipi mide kanserli

hastalarda (%0) görülmezken, kontrol grubunda da oldukça düşük frekansta gözlenmiştir (%17,3) ($\chi^2=6,880$; $p=0,009$). GC genotipi mide kanserli hastalarda (%31,4), kontrol grubuna göre düşük frekansta olduğu gözlenmiş (%48) olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($\chi^2=2,678$; $p=0,102$, OR:0,655, %95CI: 0,380-1,127). CDKN2A p16 540C→G gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde mide kanserli hastalarda (%84,29) C allel frekansının kontrol grubuna göre (%58,7) yüksek olduğu, G allel frekansının ise hasta grubunda (%15,71) kontrol grubuna (%41,3) göre düşük olduğu ve aradaki farkın istatistiksel bir anlamlılığa ulaştığı saptanmıştır ($p<0,001$) (Tablo 8).

CDKN2A p16 580C→T gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde, genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve mide kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($\chi^2=2,287$; $p>0,05$). Mide kanserli hastalar ve kontrol grubu arasında gerek C veya T allel taşıma gerekse de homozigot veya heterozigot olma açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). CDKN2A p16 580C→T gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde mide kanserli hastalarda ki allel frekansları (T allel; %8,57, C allel; %91,43) kontrol grubu ile (T allel; %16, C allel; %84) karşılaştırıldığında oldukça yakın değerlerde oldukları ve aralarında istatistiksel anlamlı bir farkın olmadığı bulunmuştur (Tablo 8).

Tablo 9 : Kolorektal kanserli hastalarda p16 540C→G ve 580C→T gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel dağılımları

Genotipler ve Alleller	Kolorektal Kanserli Hastalar n(%)	Kontroller n(%)	OR: %95 Güven Aralığı (CI)	P
P16 540C→G				
GG	2(2,39)	13(17,3)	0,133(0,031-0,589)	p<0,001
GC	27(31)	36(48)	0,647(0,437-0,957)	P=0,027
CC	58(66,7)	26(34,7)	1,923(1,363-2,714)	p<0,001
C Alleli	143(82,2)	88(58,7)		p<0,001
G Alleli	31(17,8)	62(41,3)		
P16 580C→T				
TT	4(4,6)	3(4)	1,149(0,266-4,973)	p>0,05
CT	19(21,8)	18(24)	0,910(0,517-1,602)	p>0,05
CC	64(73,6)	54(72)	1,022(0,846-1,234)	p>0,05
T Alleli	27(15,5)	24(16)		p>0,05
C Alleli	147(84,5)	126(84)		

N: birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

Tabloda seçilen genotipin, diğer tüm genotiplere karşı OR'si verilmiştir.

CDKN2A p16 540C→G gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde, genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve kolorektal kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($\chi^2=20,76$; p<0,001). p16 540C→G gen polimorfizminde GG ve GC genotipleri kolorektal kanserli hastalarda (%33,3), kontrol grubuna göre düşük frekansta gözlenmiş (%65,3) olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir ($\chi^2=16,52$; p<0,001, OR:0,510, %95CI: 0,360-0,717). CC genotipi kolorektal kanserli hastalarda (%66,7), kontrol grubuna göre yüksek frekansta

gözlenmiş (%34,7) olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmıştır ($\chi^2=16,52$; $p<0,001$, OR:1,92, %95CI: 1,363-2,714). GG genotipi kolorektal kanserli hastalarda (%2,3), kontrol grubuna göre oldukça düşük frekansta gözlenmiş (%17,3) olup, aradaki fark istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlılığa ulaşmıştır ($\chi^2=10,83$; $p<0,001$, OR:0,133, %95CI: 0,031-0,569). GC genotipi kolorektal kanserli hastalarda (%31), kontrol grubuna göre düşük frekansta olduğu gözlenmiş (%48) olup, aradaki fark ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($\chi^2=4,87$; $p=0,027$, OR:0,647, %95CI: 0,437-0,957). CDKN2A p16 540C→G gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde kolorektal kanserli hastalarda C allel frekansının (%82,18) kontrol grubuna göre (%58,67) yüksek olduğu ve farkın çok ileri düzeyde anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,001$)(Tablo 9).

CDKN2A p16 580C→T gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde, genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve kolorektal kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($\chi^2=0,129$; $p>0,05$). Kolorektal kanserli hastalar ve kontrol grubu arasında gerek C veya T allel taşıma gerekse de homozigot veya heterozigot olma açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır($p>0,05$). CDKN2A p16 580C→T gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde kolorektal kanserli hastalarda ki allel frekansları (T allel; %15,5, C allel; %84,5) kontrol grubu ile (T allel; %16, C allel; %84) karşılaştırıldığında oldukça yakın değerlerde oldukları ve aralarında istatistiksel anlamlı bir farkın olmadığı bulunmuştur (Tablo 9).

Tablo 10 : Mide kanserli hastalarda MDM2 SNP309 (T>G) gen polimorfizmine ait genotip ve allel dağılımları

Genotipler	Mide Kanserli Hastalar N (%)	Kontroller N (%)	OR %95 Güven Aralığı (CI)	P
MDM2 SNP309 (T>G)				
TT	10(28,6)	15(20)	1,429(0,715-2,855)	p>0,05
GT	16(45,7)	37(49,3)	1,100(0,752-1,610)	p>0,05
GG	9(25,7)	23(30,7)	0,839(0,434-1,619)	p>0,05
T Alleli	36(51,4)	67(44,7)		p>0,05
G Alleli	34(48,6)	83(55,3)		

N: birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

Tabloda seçilen genotipin, diğer tüm genotiplere karşı OR'si verilmiştir.

MDM2 SNP309 gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde, genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve mide kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($\chi^2=1,037$; p>0,05). MDM2 SNP 309 gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde mide kanserli hastalarda (%51,4) T allel frekansı kontrol grubuna (%44,7) göre daha yüksek saptanmış, G allel frekansıda mide kanserli hastalarda (%48,6) kontrol grubuna (%55,3) göre daha düşük frekansta saptanmış olsa da aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (p>0,05) (Tablo 10).

Tablo 11 : Kolorektal kanserli hastalarda MDM2 SNP309 (T>G) gen polimorfizmine ait genotip ve allel dağılımları

Genotipler	Kolorektal Kanserli Hastalar N (%)	Kontroller N (%)	OR %95 Güven Aralığı (CI)	P
MDM2 SNP309 (T>G)				
TT	17(19,5)	15(20)	0,977(0,525-1,820)	p>0,05
GT	57(65,5)	37(49,3)	1,328(1,008-1,749)	p=0,037
GG	13(14,9)	23(30,7)	0,487(1,030-1,461)	P=0,016
T Alleli	91(52,3)	67(44,7)		p>0,05
G Alleli	83(47,7)	83(55,3)		

N : birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

Tabloda seçilen genotipin, diğer tüm genotiplere karşı OR'si verilmiştir.

MDM2 SNP309 gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde, genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve kolorektal kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($\chi^2=6,30$; $p=0,43$). Kolorektal kanserli hastalarda gerek G alleli taşıma gerekse TT genotipi taşıma kontrol grubu ile kıyaslandığında birbirine çok yakın frekanstaydı ve arada istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Kolorektal kanserli hastalarda GT genotipi taşımak (%65,5) kontrol grubuna göre daha yüksek frekansta olup fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,037$, OR:1,328, %95 CI: 1,008-1,749). Kolorektal kanserli hastalarda T alleli taşıma frekansı (%85,1) kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuş olup gözlenen bu fark istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p=0,016$, OR:1,227, %95 CI: 1,030-1,461). MDM2 SNP 309 gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde kolorektal kanserli hastalarda T allel frekansı (%52,3) kontrol grubuna göre (%44,7) daha yüksek saptanmış olsa da aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$) (Tablo 11).

Tablo 12 : Kolorektal ve mide kanserli hastalarda p16 (540C→G, 580 C→T) kombine genotip analiz sonuçları

P16 540580	Kolorektal Kanserli Hastalar N (%)	Kontroller N (%)	Mide Kanserli Hastalar N (%)
GGTT	0(0)	2(2,7)	0(0)
GGCT	1(1.1)	3(4)	0(0)
GGCC	1(1.1)	8(10,7)	0(0)
GCTT	1(1.1)	0(0)	0(0)
GCCT	6(6.9)	7(9,3)	1(2,9)
GCCC	20(23)	29(38,7)	10(28,6)
CCTT	3(3.4)	1(1,3)	0(0)
CCCT	12(13.8)	8(10,7)	5(14,3)
CCCC	43(49.4)	17(22,7)	19(54,3)

N:birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

CDKN2A gen polimorfizmleri sonucunda p16 540C→G, p16 580C→T kombine genotip analizi yapıldığında, CCCC kombine genotipi kolorektal (%49,4) ve mide kanserli (%54,3) hasta gruplarında diğer tüm kombine tiplere oranla daha yüksekti ve bu değer kontrol grubundaki değerle (%22,7) karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlılık göstermekteydi (kolorektal kanserli hasta grubu için, $p<0,001$, OR: 2,181, %95 CI: 1,364-3,485) (mide kanserli hasta grubu için, $p<0,001$, OR: 2,395, %95 CI: 1,428-4,016). Kombine genotip analizi sonrasında kontrol grubunda en yüksek frekans gösteren kombine genotip ise GCCC (%38,7) olup, kolorektal kanserli hasta grubundaki frekansı daha düşüktü (%23) ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı olarak saptandı ($p=0,030$, OR:0,595, %95 CI:0.368-0.960). Mide kanserli hasta grubunda ise GCCC genotipinin frekansı %28,6'ydı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamıştı ($p>0,05$, OR:0,739, %95 CI: 0,407-1,347) (Tablo 12).

Tablo 13 : Kolorektal ve mide kanserli hastalarda MDM2 (SNP309), p16 (540C→G) kombine genotip analiz sonuçları

MDM2P16540C→G	Kolorektal Kanserli Hastalar N (%)	Kontroller N (%)	Mide Kanserli Hastalar N (%)
TTGG	0(0)	3(4)	0(0)
TTGC	8(9,2)	7(9,3)	3(8,6)
TTCC	9(10,3)	5(6,7)	7(20)
GTGG	2(2,3)	4(5,3)	0(0)
GTGC	16(18,4)	19(25,3)	7(20)
GTCC	39(44,8)	14(18,7)	9(25,7)
GGGG	0(0)	6(8)	0(0)
GGGC	3(3,4)	10(13,3)	1(2,9)
GGCC	10(11,5)	7(9,3)	8(22,9)

N: birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

MDM2 SNP309 ve p16 540C→G polimorfizmlerinin sonucunda elde ettiğimiz genotiplerin kombine genotip analizindeki frekanslarına bakıldığında, kolorektal (%44,8) ve mide (%25,7) kanserli hastalarda GTCC'nin diğer kombine genotiplere göre en yüksek frekansı gösterdiği saptandı. GTCC kombine genotipinin kontrol grubunda ise daha düşük (%18,7) frekansta olduğu saptanmış olup, kolorektal kanserli hasta grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak da ileri düzeyde anlamlıydı ($p<0,001$ OR:2,401, %95 CI: 1,418-4,067). Mide kanserli hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki fark ise anlamlı bulunmadı ($p>0,05$, OR:1,378, %95 CI: 0,661-2,873). Kontrol grubunda en yüksek frekansta gözlenen kombine genotipin GTGC olduğu görülmüş olup (%25,3) kolorektal ve mide kanserli hastalarda söz konusu kombine genotipin daha düşük frekanta olduğu saptanmış olsa da fark istatistiksel olarak anlamlılık göstermemekteydi ($p>0,05$) (Tablo 13).

Tablo 14 : Kolorektal ve mide kanserli hastalarda MDM2 (SNP309), p16 (580C→T) kombine genotip analiz sonuçları

MDM2P16580C→T	Kolorektal Kanserli Hastalar N (%)	Kontroller N (%)	Mide Kanserli Hastalar N (%)
TTTT	0(0)	0(0)	0(0)
TTCT	2(2,3)	4(5,3)	4(11,4)
TTCC	15(17,2)	11(14,7)	6(17,1)
GTTT	3(3,4)	1(1,3)	0(0)
GTCT	13(14,9)	9(12)	2(5,7)
GTCC	41(47,1)	27(36)	14(40)
GGTT	1(1,1)	2(2,7)	0(0)
GGCT	4(4,6)	5(6,7)	0(0)
GGCC	8(9,2)	16(21,3)	9(25,7)

N:birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

MDM2 SNP309 ve p16 580C→T genotiplerinin kombine genotip analizindeki frekanslarına bakıldığında, GTCC kombine genotipinin hem kolorektal kanserli hastalarda (%47,1), hem mide kanserli hastalarda (%40), hem de kontrol grubunda (%36) diğer kombine genotiplere göre en yüksek frekansı gösterdiği saptanmış olup herhangi bir istatistiksel anlamlı değere ulaşamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 14).

Tablo 15 : Kolorektal Kanserli Hastalarda p16 540C→G Allel Dağılımları ile Hastaların Klinik, Prognostik Parametrelerinin Değerlendirilmesi

P16 540C→G Genotipleri	GG+GC N (%)	CC N (%)	N	P	CC+GC N (%)	GG N (%)	N	P
Cins								
Kadın	10(31,3)	22(68,8)	32	p>0,05	31(96,9)	1(3,1)	32	p>0,05
Erkek	19(34,5)	36(65,5)	55		54(98,2)	1(1,8)	55	
Sigara kullanımı								
Sigara içen	1(16,7)	5(83,3)	6	p>0,05	6(100)	0(0)	6	p>0,05
Sigara içmeyen	28(34,6)	53(65,4)	81		79(97,5)	2(2,5)	81	
Ailede Ca Hikayesi								
Var	0(0)	3(100)	3	p>0,05	3(100)	0(0)	3	p>0,05
Yok	29(34,5)	55(65,5)	84		82(97,6)	2(2,4)	84	
Tümör derecesi								
T3+T4	24(33,3)	48(66,7)	72	p>0,05	70(97,2)	2(2,8)	72	p>0,05
T1+T2	5(33,3)	10(66,7)	15		15(100)	0(0)	15	
Lenf nodu tutulumu								
N(+)	11(25)	33(75)	44	p>0,05	42(95,5)	2(4,5)	44	p>0,05
N(-)	18(41)	25(58,1)	43		43(100)	0(0)	43	
Uzak Metastaz								
Var	7(38,9)	11(61,1)	18	p>0,05	17(94,4)	1(5,6)	18	p>0,05
Yok	22(31,9)	47(68,1)	69		68(98,6)	1(1,4)	69	
Anjiyolenfatik invazyon								
Pozitif (+)	14(35,9)	25(64,1)	39	p>0,05	38(97,4)	1(2,6)	39	p>0,05
Negatif (-)	15(31,3)	33(68,8)	48		47(97,9)	1(2,1)	48	
Perinöral inv.								
Pozitif (+)	10(32,3)	21(67,7)	31	p>0,05	30(96,8)	1(3,2)	31	p>0,05
Negatif (-)	19(33,9)	37(66,1)			55(98,2)	1(1,8)	56	

N: birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

Kolorektal kanserli hastalarda CDKN2A p16 540C→G gen polimorfizmine ait gerek G alleli gerekse C alleli taşıma durumu incelendiğinde cins, sigara kullanımı, ailede kanser hikayesi varlığı, tümör büyüklüğü evresi, uzak metastaz varlığı, anjiyolenfatik invazyon ve perinöral invazyon parametreleri ile aralarında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Ancak kolorektal kanserli hastalarda p16 540C→G gen polimorfizmi ile hastalarda lenf nod metastazı varlığı açısından bir ilişki saptanmış olup, buna göre lenf nod metastaz varlığı olan kolorektal kanserli hastalarda GG veya CC genotipini homozigot olarak taşıma frekansının (%79,5) homozigot genotip taşıyan

ancak lenf nod metastazı negatif olan hastalara göre (%58,1) istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,031, OR: 1,368 %95 CI: 1,019-1,837) (Tablo 15).

Tablo 16 : Kolorektal Kanserli Hastalarda p16 580C→T Allel Dağılımları ile Hastaların Klinik, Prognostik Parametrelerinin Değerlendirilmesi

P16 580C→T genotipleri	CC+CT N (%)	TT N (%)	N	P	TT+CT N (%)	CC N (%)	N	P
Cins								
Kadın	32(100)	0(0)	32	p>0,05	9(28,1)	23(71,9)	32	p>0,05
Erkek	51(92,7)	4(7,3)	55		14(25,5)	41(74,5)	55	
Sigara kullanımı								
Sigara içen	6(100)	0(0)	6	p>0,05	1(16,7)	5(83,3)	6	p>0,05
Sigara içmeyen	77(95,1)	4(4,9)	81		22(27,2)	59(72,8)	81	
Ailede Ca Hikayesi								
Var	3(100)	0(0)	3	p>0,05	1(33,3)	2(66,7)	3	p>0,05
Yok	80(95,2)	4(4,8)	84		22(26,2)	66(73,8)	84	
Tümör derecesi								
T3+T4	69(95,8)	3(4,2)	72	p>0,05	18(25)	54(75)	72	p>0,05
T1+T2	14(93,3)	1(6,7)	15		5(33,3)	10(66,7)	15	
Lenf nodu tutulumu								
N(+)	40(90,9)	4(9,1)	44	p>0,05	15(34,1)	29(65,9)	44	p>0,05
N(-)	43(100)	0(0)	43		8(18,6)	35(81,4)	43	
Uzak Metastaz								
Var	17(94,4)	1(5,6)	18	p>0,05	5(27,8)	13(72,2)	18	p>0,05
Yok	66(95,7)	3(4,3)	69		18(26,1)	51(73,9)	69	
Anjiyolenfatik invazyon								
Pozitif (+)	37(94,9)	2(5,1)	39	p>0,05	14(35,9)	25(64,1)	39	p>0,05
Negatif (-)	46(95,8)	2(4,2)	48		9(18,8)	39(81,2)	48	
Perinöral inv.								
Pozitif (+)	31(100)	0(0)	31	p>0,05	6(19,4)	25(80,6)	31	p>0,05
Negatif (-)	52(92,9)	4(7,1)	56		17(30,4)	39(69,6)	56	

N:birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

Kolorektal kanserli hastalarda CDKN2A p16 580C→T gen polimorfizmine ait C veya T alleli taşıma durumu incelendiğinde cinsiyet, sigara kullanımı, ailede kanser hikayesi varlığı, tümör büyüklüğü evresi, uzak metastaz varlığı, anjiyolenfatik invazyon

ve perinoral invazyon parametreleri ile aralarında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Fakat kolorektal kanserli hastalarda p16 580C→T gen polimorfizminde lenf nodu tutulumu olan hastaların 4(%9,1) TT genotipi taşıdığı gözlenirken, lenf nodu tutulumu olmayan hastaların hiçbirinde TT genotipine rastlanmamıştır ve aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamıştır. (p>0,05 , OR: 0,909, %95 CI: 0,828-0,998) (Tablo 16).

Tablo 17 : Kolorektal Kanserli Hastalarda MDM2 (SNP309 T>G) Allel Dağılımları ile Hastaların Klinik, Prognostik Parametrelerinin Değerlendirilmesi

MDM2 SNP309 T>G genotipleri	TT+TG N (%)	GG N (%)	N	P	GG+GT N (%)	TT N (%)	N	P
Cins								
Kadın	29(90,6)	3(9,4)	32	p>0,05	25(78,1)	7(21,9)	32	p>0,05
Erkek	45(81,8)	10(18,2)	55		45(81,8)	10(18,2)	55	
Sigara kullanımı								
Sigara içen	4(66,7)	2(33,3)	6	p>0,05	6(100)	0(0)	6	p>0,05
Sigara içmeyen	70(86,4)	11(13,6)	81		64(79)	17(21)	81	
Ailede Ca Hikayesi								
Var	3(100)	0(0)	3	p>0,05	3(100)	0(0)	3	p>0,05
Yok	71(84,5)	13(15,5)	84		67(79,8)	17(20,2)	84	
Tümör derecesi								
T3+T4	60(83,3)	12(16,7)	72	p>0,05	57(79,2)	15(20,8)	72	p>0,05
T1+T2	14(93,3)	1(6,7)	15		13(86,7)	2(13,3)	15	
Lenf nodu tutulumu								
N(+)	35(79,5)	9(20,5)	44	p>0,05	38(86,4)	6(13,6)	44	p>0,05
N(-)	39(90,7)	4(9,3)	43		32(74,4)	11(25,6)	43	
Uzak Metastaz								
Var	15(83,3)	3(16,7)	18	p>0,05	17(94,4)	18(5,6)	18	p>0,05
Yok	59(85,5)	10(14,5)	69		53(76,8)	16(23,2)	69	
Anjiyolenfatik invazyon								
Pozitif (+)	31(79,5)	8(20,5)	39	p>0,05	34(87,2)	5(12,8)	39	p>0,05
Negatif (-)	43(89,6)	5(10,4)	48		36(75)	12(25)	48	
Perinöral inv.								
Pozitif (+)	27(87,1)	4(12,9)	31	p>0,05	27(87,1)	4(12,9)	31	p>0,05
Negatif (-)	47(83,9)	9(16,1)	56		43(76,8)	13(23,2)	56	

N:birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

Kolorektal kanserli hastalarda MDM2 (SNP309 T>G) gen polimorfizmine ait gerek T alleli gerekse G alleli taşıma durumu incelendiğinde cins, sigara kullanımı, ailede kanser hikayesi varlığı, tümör büyüklüğü evresi, lenf nod metastaz pozitifliği, uzak metastaz varlığı, anjiyolenfatik invazyon ve perinöral invazyon parametreleri ile aralarında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 17).

Tablo 18 : Mide Kanserli Hastalarda p16 540C→G, p16 580C→T, MDM2 (SNP309 T>G) Genotip Dağılımları ile Hastaların Klinik, Prognostik Parametrelerinin Değerlendirilmesi

	P16 540 C → G			P16 580 C → T			MDM2 SNP309 (T>G)		
	GG n(%)	GC n(%)	CC n(%)	CC n(%)	CT n(%)	TT n(%)	TT n(%)	GT n(%)	GG n(%)
Cinsiyet									
Kadın	0(0)	3(33,3)	6(66,7)	7(77,8)	2(22,2)	0(0)	1(11,1)	5(55,6)	3(33,3)
Erkek	0(0)	8(30,8)	18(69,2)	22(84,6)	4(15,4)	0(0)	9(34,6)	11(42,3)	6(23,1)
Sigara Kullanımı									
Pozitif (+)	0(0)	1(100)	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	1(100)	0(0)
Negatif (-)	0(0)	10(29,4)	24(70,6)	28(82,4)	6(17,6)	0(0)	10(29,4)	15(44,1)	9(26,5)
Alkol Kullanımı									
Pozitif (+)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Negatif (-)	0(0)	11(31,4)	24(68,6)	29(82,9)	6(17,1)	0(0)	10(28,6)	16(45,7)	9(25,7)
Ailede Ca Hikayesi									
Pozitif (+)	0(0)	0(0)	1(100)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	1(100)	0(0)
Negatif (-)	0(0)	11(32,4)	23(67,6)	28(82,4)	6(17,6)	0(0)	10(29,4)	15(44,1)	9(26,5)
Tümör derecesi									
T3+T4	0(0)	2(20)	8(80)	9(90)	1(10)	0(0)	3(30)	6(60)	1(10)
T1+T2	0(0)	4(36,4)	7(63,6)	8(72,7)	3(27,3)	0(0)	4(36,4)	4(36,4)	3(27,3)
Lenf nodu tutulumu									
N(+)	0(0)	4(26,7)	11(73,3)	11(73,3)	4(26,7)	0(0)	5(33,3)	7(46,7)	3(20)
N(-)	0(0)	2(33,3)	4(66,7)	6(100)	0(0)	0(0)	2(33,3)	3(50)	1(16,7)
Uzak Metastaz									
Var	0(0)	3(50)	3(50)	4(66,7)	2(33,3)	0(0)	4(66,7)	2(33,3)	0(0)
Yok	0(0)	3(20)	12(80)	13(86,7)	2(13,3)	0(0)	3(20)	8(53,3)	4(26,7)
Anjiyolenfatik invazyon									
Pozitif (+)	0(0)	3(27,3)	8(72,7)	9(81,8)	2(18,2)	0(0)	3(27,3)	5(45,5)	3(27,3)
Negatif (-)	0(0)	3(30)	7(70)	8(80)	2(20)	0(0)	4(40)	5(50)	1(10)
Perinöral inv.									
Pozitif (+)	0(0)	2(20)	8(80)	8(80)	2(20)	0(0)	4(40)	5(50)	1(10)
Negatif (-)	0(0)	4(50)	4(50)	7(87,5)	1(12,5)	0(0)	2(25)	4(50)	2(25)
Histolojik Evrelendirme									
Az, kötü differansiye	0(0)	4(36,4)	7(63,6)	9(81,8)	2(18,2)	0(0)	4(36,4)	5(45,5)	2(18,2)
İyi veya orta differansiye	0(0)	2(20)	8(80)	8(80)	2(20)	0(0)	3(30)	5(50)	2(20)
Tümör nekrozu									
Pozitif (+)	0(0)	3(42,9)	4(57,1)	7(100)	0(0)	0(0)	1(14,3)	4(57,1)	2(28,6)
Negatif (-)	0(0)	2(20)	8(80)	7(70)	3(30)	0(0)	5(50)	4(40)	1(10)

N:birey sayısı; gruplararası analiz Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

Mide Kanserli Hastalarda P16 540C→G, P16 580C→T, MDM2 (SNP309 T>G) gen polimorfizmine ait genotip dağılımları incelendiğinde cinsiyet, sigara kullanımı, alkol kullanımı, ailede kanser hikayesi varlığı, tümör büyüklüğü evresi, lenf nodu tutulumu, uzak metastaz varlığı, anjiyolenfatik invazyon, perinoral invazyon, histolojik evrelendirme ve tumor nekrozu varlığı parametreleri ile aralarında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 18).

5. TARTIŞMA

Mide ve kolorektal kanser gibi gastrointestinal sistem kanserleri diğer tüm tip kanserlerde olduğu gibi büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, anjiyogenik faktörler, hücre döngü regülatörleri ya da DNA tamir genleri gibi pek çok gende oluşan çeşitli genetik ve epigenetik değişimlerin birikmesiyle karakterize çok aşamalı bir süreçtir. Genetik polimorfizm çalışmaları günümüzde kanser riski ya da progresyonu ile ilişkili ve aynı zamanda anti-kanser ilaçların toksisitesi ve tedavideki etkinliği gibi pek çok önemli konuda hastalığın teşhis ve tedavi sürecinde öncü olabilecek aydınlatıcı bilgiler sunmaktadır (142). Hücre döngü işleyişinde önemli rolü bulunan p16 proteinini CDK4 ve CDK6'nın spesifik bir inhibitörü olup malignitelerin çoğunda aday bir tümör baskılayıcı gen olarak ifade edilir. p16 proteininin işlev kaybı, onun büyüme baskılayıcı özelliklerinin inaktivasyonunda oldukça önemli olduğu bilinmektedir (143).

Günümüze kadar p16 gen bölgesine ait delesyonlar, mutasyonlar ve polimorfizmler malign melanomda beyin tümörleri, pankreatik kanser gibi kanser türlerinde araştırılmıştır (144, 145, 146). CDKN2A'da gözlenen diğer mutasyonlar arasında 3'UTR'de yer alan Nt500 C>G ve Nt540 C>T mutasyonlarının kanserde risk ile ilişkili olmadığına dair yapılmış çalışmalar mevcut olup konu halen tartışmalıdır (144,147). Melanomlu hastalarda yapılan çalışmalarda, 3' UTR bölgesindeki allelerin prevalansının yüksek olduğu rapor edilerek bu bölgeye dikkat çekilmiştir. Huber ve arkadaşları melanomlu hastalarda yaptıkları çalışmada 500 C/G allelinin frekansını %31.8, 540 C/T allelinin frekansını ise %27.3 olarak bulmuşlardır (148). Kumar ve arkadaşları ise kontrol gruplarında yaptıkları çalışmada 500 C/G allelinin frekansını % 11.7 ve 540 C/T allelinin kinisi ise %8.5 olarak rapor etmişlerdir (149). Biz çalışmamızda mide ve kolorektal kanserlerde p16 540C→G ve 580C→T polimorfizmlerinin hastalığın riski, klinik ve patolojik parametreler ile ilişkisi olup olmadığını değerlendirmeyi amaçladık.

p16 genine ait mutasyonları analiz etmek ve bu mutasyonları çeşitli tümör vakalarındaki risk faktörü olup, olmadığını belirlemek amacıyla çeşitli coğrafi bölgelerdeki popülasyonlarda birçok çalışma yapılmıştır (150). İsveç popülasyonunda primer melanom vakalarında yapılan çalışmadaki 540C→G polimorfizminin popülasyondaki heterozigot sıklığı %29, yine aynı polimorfizmin benzer

popülasyonlardaki heterozigot sıklık değerinin %22 olduğu bildirilmiştir. İsveç popülasyonundaki 580C→T polimorfizmine ait heterozigotluk sıklığı %26 olarak bildirilmiş olup, aynı değerin Avusturalya’da yapılmış bir aile çalışmasında da gözleendiği bildirilmiştir (151,152). Biz çalışmamızda p16 540C→G polimorfizmine ait heterozigot GC genotipini %48, homozigot CC genotipini %34,7 ve GG genotipini ise %17,3 olarak bulduk. P16 580C→T polimorfizmine ait CT genotipinin frekansı %24 olup İsveç ve Avusturalya popülasyonlarında gözlenen değerle uyumlu bulunmuştur.İsveç’ de primer melanomlu hastalarda yapılan bir çalışmada vakaların % 26’sında p16 gen bölgesinde 580 C→ T dönüşümü tespit edilmiş ve bu polimorfik yapının heterozigotluk değeri 0.26 olarak bulunmuştur (151).

Chen ve arkadaşları, C540G ve C580T genotiplerini pankreas kanserli hastalarda hastalığın riski açısından araştırdıklarında istatistiksel anlamlılığı olan bir fark saptamamışlardır (153). Aynı şekilde Zheng ve arkadaşları baş ve boyun, skuamöz hücre kanser riski ile söz konusu polimorfizmler arasında bir ilişki saptamadıklarını bildirmişlerdir (154). Çalışmamızda mide kanserli hastalarda p16’nın 540C→G polimorfizmine ait gerek CC genotipi gerekse de C allel frekansı kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$). Çalışmamızda kolorektal kanserli hastalarda da yine CC genotipi ve C allel frekansının kontrol grubuna göre çok ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmış olup, p16 540C→G heterozigot genotipi taşımanın kolorektal kanserli hastalarda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak düşük olması($p=0,027$) bu genotipin koruyucu özelliği taşıyabileceği kanısını uyandırmıştır. p16 580C→T gen polimorfizmi sonuçlarımız mide kanserli ve kontrol grubu arasında hastalık riski açısından değerlendirildiğinde, hasta ve kontrol grubu arasında gerek genotip dağılımı gerekse de allel frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir veri saptanmamıştır. Bu durum kolorektal kanserli hastalar ile kontrol grubu analiz edildiğinde de eşdeğer sonuçlara ulaşılmıştır. Litaratürde gerek p16 580C→T gerekse 540C→G gen polimorfizmleri ilişkili olabileceği düşünülen diğer genlerdeki polimorfizmler ile birlikte çalışılmıştır. Buna göre Chen ve arkadaşlarının, pankreas kanserli 148 Kafkas hasta üzerinde yaptıkları çalışmada p16 bölgesindeki C580T polimorfizminin Aurota T91A polimorfizmi ile sinerjik olarak bir araya geldiğinde, pankreas kanserinin diyagnozu açısından yaşa bağlı riskte önemli bir etkisi olduğu, doğal tipe göre pankreas kanseri riskini 3.88 kat arttırdığı rapor edilmiştir (153).

Çalışmamızda p16 540C→G ve 580C→T polimorfizmleri bir arada incelendiğinde mide (%54,3) ve kolorektal kanserli (%49,4) hastalarda CCCC kombine genotipinin diğer kombine genotiplere oranla en yüksek frekansı gösterdiği ve değerlerin kontrol grubundaki değerle (%22,7) karşılaştırılması sonrasında farkın her iki hasta grubu içinde çok ileri düzeyde anlamlı olduğu saptanmıştır (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$). Söz konusu iki gen polimorfizminin kombine genotip analizi sonrasında kontrol grubunda en yüksek frekansta bulunan GCCC (%38,7) kombine genotipinin kolorektal kanserli hastalarda (%23) istatistiksel anlamlı olarak daha düşük ($p=0,030$) olduğu mide kanserli grupta (%28,6) ise yine bu değerden düşük gözlenip aradaki farkın ise istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığı saptanmıştır.

Kolorektal kanserli hastalarda CDKN2A p16 540C→G gen polimorfizmine ait G veya C alleli taşıma durumları analiz edildiğinde cins, sigara kullanımı, ailede kanser hikayesi varlığı, tümör büyüklüğü evresi, , uzak metastaz varlığı, anjiyolenfatik invazyon ve perinoral invazyon parametreleri ile aralarında istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Çalışmamıza dahil olan mide kanserli hastalarda p16 540C→G ve 580C→T polimorfizmlerine ait gerek genotip dağılımları gerekse allel taşıma frekansları incelendiğinde hastaların klinik ya da patolojik her hangi bir parametresi ile ilişkili olmadığı saptanmıştır.

Sauroja ve arkadaşları ise sporadik melanomlu 102 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada p16'nın C540G ve C580T polimorfizmlerinin tümör agresifliği ve metastaza daha kısa sürede geçişle bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir (155). Bizim çalışmamızda kolorektal kanserli hastalarda p16 540C→G gen polimorfizmi ile hastalarda homozigot genotipleri taşıma frekansının, lenf nod metastazı varlığı olan hastalarda (%79,5) aynı genotipi taşıyan ancak lenf nod metastaz varlığı olmayan hastalara (%58,1) göre daha yüksek olduğu saptanmış olup aradaki fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p=0,03$). Çalışmamızda 580C→T polimorfizm sonuçlarının kolorektal kanserli hastalarda lenf nod tutulumu açısından değerlendirilmesi sonrasında 44 hastadan 4'ünün (% 9.1) TT genotipi taşıırken, lenf nod metastazı negatif hiçbir hastanın bu genotipi taşıması da ilgi çekici bir diğer bulgumuzdur.

CDKN2A'nın kodladığı iki transkriptten biri olan p16 pRB tümör baskılayıcı genini inaktive eden hücre siklusu aktivatörleri CDK4 ve CDK6'nın bir inhibitörü iken, p14 tp53'ün degradasyonundan sorumlu olan MDM2'yi inaktive etmektedir (156,157).

MDM2, p53 proteinin önemli bir düzenleyicisidir (158,159). MDM2 SNP309 G allelinin frekansı Afrika-Amerika'lılarda yaklaşık %10, beyaz ırkta %40, Asya toplumunda ise %50 olduğu bildirilmiştir (160). Çalışmamızda MDM2 SNP309 G allel frekansı sağlıklı kontrollerde %55,3 olarak saptanmış olup, Asya toplumu ile benzerlik gösterdiği gözlemlenmiştir. MDM2 gen bölgesi üzerinde hem promoter bölgede hem de promoter dışı bölgelerde SNP309 gibi diğer başka polimorfizmler de rapor edilmiştir. Kafkaslar, Afrikalı Amerikanlar ve Aşkenazi Yahudilerinde SNP 309T allelindeki çeşitliliğin G allele göre daha fazla olduğu rapor edilmiştir (161).

Knappskog ve arkadaşları SNP 309G allelinin, SNP309 T allele kıyasla Sp1 transkripsiyon faktörüne olan afinitesi daha fazla (bağlanma gücünde % 22 artış) olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışma bununla birlikte aynı gen bölgesindeki başka bir polimorfizm olan SNP285C ise Sp1 transkripsiyon faktörünün MDM2 promoterına bağlanma afinitesini düşürdüğünü de göstermektedir. (bağlanma gücünde % 51 düşüş) (162). Aynı bulgulara Bond ve arkadaşları da yaptıkları çalışma ile ulaşmışlardır (163).

MDM2 SNP 309'nin kanser riski üzerindeki etkilerini analiz eden birçok çalışma yapılmıştır. Buna göre 309. Nükleotiddeki T-G dönüşümünün (SNP 309), Sp1 transkripsiyonel aktivatörünün spesifik bağlanma afinitesini artırması nedeniyle MDM2 mRNA/protein seviyelerini arttırdığı ileri sürülmüştür (163). Hong ve arkadaşları 2005 yılında MDM2 GG genotipinin, GT veya TT genotiplerine kıyasla özofagus skuamöz hücre kanseri riski ile ilişkili olduğunu gözlemlemiştir (164).

Xu ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, prostat kanserli hastalar ve kontrol grubu arasında GG/GT'ye karşılık TT genotipi arasında önemli bir farklılık olduğunu bildirmişlerdir (165). Bu çalışmanın bulguları Stoeher ve arkadaşlarının çalışması ile paraleldir. Söz konusu çalışmada Stoeher ve arkadaşları MDM2 SNP 309 polimorfizmine ait TT ve GG/Gt genotiplerini karşılaştırdıklarında, bu polimorfizmle prostat kanseri riski arasında anlamlı bir ilişki bulmamışlardır (166).

SNP 309 lokusunu içeren MDM2 promoter bölgesinin ve SNP 309'a ait G allelinin nükleer hormon reseptörlerinin iyi karakterize edilmiş bir ko-transkripsiyonel aktivatörü olan Sp1'in afinitesini değiştirdiği gösterilmiştir (163, 167). Daha önceki çalışmalarda, difüze büyük B hücresi lenfoma, yumuşak doku sarkomu, invazif duktal meme karsinomu ve kolorektal kanser görülen hastalarda MDM2 SNP309'un tümör oluşumunu hızlandırdığını desteklemektedir (168,169).

Yakınlarda yapılan çalışmalarda Avrupa, Kuzey Amerika ve iki Asya popülasyonunda MDM2 SNP 309 ve akciğer kanseri riski arasında bir ilişki bulunmamıştır. Ancak Çin’de, Norveç’de ve Amerika’daki İspanyol olmayan beyazlar arasında GG genotipinin riski arttırdığı rapor edilmiştir. Bazı vakalarda MDM2 SNP309 ve kansere yatkınlık arasında bir ilişki olmadığında bile, gruplar alt katmanlarına ayrıldığında bazı ilişkiler saptanmıştır. Örneğin, yalnızca adenokarsinomda GG genotipi ile artan bir risk saptanmış, ancak aynı durum küçük hücreli, skuamöz hücre veya büyük hücreli akciğer kanserlerinde veya tüm akciğer kanseri alt türleri gruplandığında söz konusu olmamıştır (170, 171,172,173,174). Yedi çalışmanın incelendiği bir meta-analizde, GG genotipi küçük ancak önemli ölçüde artan bir kanser riskine işaret etmektedir(175). Polimorfizmin p53 yolağı üzerindeki MDM2 inhibitör etkisini artırma kapasitesi nedeniyle, araştırmacılar GG genotipinin aynı zamanda akciğer kanserindeki prognozu da negatif yönde etkileyeceğini öngörmüşlerdir. Günümüze kadar, GG genotipinin düşük seviyede p53 ekspresyonu ve düşük sürvi ile ilişkisini gösteren iki çalışma bulunmaktadır (176, 177).

Çalışmamızda mide kanserli hastalarda MDM2 SNP309 genotip dağılımı ve allel frekansları hastalığın riski ile ilişkili bulunmamıştır. Buna karşı kolorektal kanserli hastalarımızda GT genotipiine sahip olma frekansı (%65,5) kontrol grubuna göre (%49,3) istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur. Allel frekansları açısından kolorektal kanserli hastalar incelendiğinde kolorektal kanserli hastalarda T allel taşıma frekansı kontrol grubuna göre daha yüksek olup fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Litaratürde her ne kadar G alleli veya GG genotipi taşımanın kanser riski ile oldukça ilişkili olduğu pek çok çalışmada bildirilmiş olsa da yapılan bazı çalışmalarda bunun tersi sonuçlarda yer almaktadır.

Chua ve arkadaşları, MDM2 SNP309 TT genotipinin Çin popülasyonunda hiç sigara içmemiş kadınlardaki akciğer kanseri riski ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.Bu çalışma, risk faktörlerinin sigara içmeden bağımsız olarak değerlendirilebildiği sigara içmeyen kadınlar arasında yapılmış tek çalışmadır (178). MDM2 TT genotipinin riski artırıyor olması, daha önce birçok çalışmada risk artışının GG genotipi ile ilişkili bulunmuş olması ve bu genotipin MDM2 RNA ve protein seviyeleri ve sonuç olarak p53 inhibisyonu üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde beklenmeyen bir sonuçtur (163).Yakın zamanlarda Çin’deki meme kanseri örnekleri üzerinde yapılan çalışmalar

da TT genotipini kanser riskinin artması ile ilişkili bulmuştur (179) ve GG genotipinin lösemi riskini düşürdüğünü göstermiştir (180). Ayrıca, başka bir çalışma da Çin popülasyonunda TT genotipi ile akciğer kanseri riski artışı arasında bir ilişkiye işaret etmiştir (181). Bu nedenle G veya T allellerinin kanser riski artışıyla veya başlangıç yaşıyla olan ilişkisinin etnik yapı ve çevresel faktörlerden etkilenmesi de olasıdır. Bu bulguların genişletilmesi için daha başka çalışmalar yapılması gerekmektedir. TT genotipinin kanser riskine nasıl yol açtığı henüz net olarak anlaşılmamıştır, ancak MDM2'nin tümörjenezdeki rolünün cinsiyete bağlı olarak ve sigara içenlerle sigara içmeyenler arasında çeşitlilik gösterdiği gösterilmiştir. Bu nedenle MDM2'nin akciğer kanseri riskini modüle etme mekanizması popülasyonlar arasında değişkenlik gösterebilir. Hormonların karsinogenezdeki rolü, kompleks ancak önemli bir yolak olarak dikkati çekmektedir (178).

SNP 309'daki G alleli, MDM2 promoter bölgesinin, östrojen reseptörünün ko-transkripsiyonel aktivatörü olan Sp1 afinitesini arttırmaktadır ve MDM2 ekspresyonunun artması ile ilişkilidir.

Bond ve arkadaşları MDM2 polimorfizminin (GG) cinsiyete özgü olduğunu ve aktif östrojen sinyal yolağı olan kadınlarda arttığını bildirmiştir (168). Bu nedenle, TT genotipinin düşük MDM2 seviyeleriyle ilişkili olduğunu söylemek olasıdır. Ancak, MDM2'nin aynı zamanda ER ekspresyonunu negatif yönde etkilediği de rapor edilmiştir (183). Bu bağlamda, TT bireylerde düşük MDM2 seviyelerinin ER ekspresyonunun artmasına neden olması ve daha detaylı çalışılması gereken bir hipotez olsa da kanser riskini arttırması olasıdır.

Östrojen reseptörlerinin akciğer kanserlerinde, özellikle adenokarsinomlarda ekspres edildiği ve bu hücrelerin östrojene birer cevap oldukları göz önünde bulundurulacak olursa, hormonal yolakların MDM2'nin akciğer kanseri riskini etkilediği alternatif bir mekanizmayı ortaya çıkarmak mümkündür. Alternatif olarak diğer MDM2'ye bağlı yolakların da TT genotipli bireylerde modifiye olmuş olabilmekte ve sonuç olarak kanere yatkınlığa yol açabilmektedir. Bu bağlamda, spesifik sinyal yolaklarının MDM2 SNP'leri ile ilişkisini değerlendiren çalışmalar bulunmamaktadır (183,184).

MDM2 SNP309 TT genotipinin sigara içmeyen Çinli kadınlarda akciğer kanseri için bir risk faktörü olduğu öne sürülmektedir. Bu çalışmada olduğu gibi G alleli ya da

GG genotipi taşımanın kanser riski ile bağlantılı olma durumunun aksini savunan çalışmalar da MDM2'nin sigara içimi gibi çevresel ya da hormonal pek çok faktörden etkilenebileceği kendine özgü bir mekanizması olabileceği hipotezi ortaya atılmaktadır (178).

Çalışmamızda MDM2 SNP309 gen polimorfizmi gerek kolorektal gerek mide kanserli hastalarda cinsiyet, sigara kullanımı, alkol tüketimi, ailede kanser hikayesi gibi parametrelerin hiç biri ile ilişkili bulunmamıştır.

Shinohara ve arkadaşlarının mesane kanserli hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada, MDM2 T/G + G/G genotiplerinin mesanenin korunması açısından olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (185). Daha önceki çalışmalarda MDM2 SNP 309G allelinin MDM2 mRNA seviyelerinde artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir (163). Ko ve arkadaşları MDM2 mRNA ekspresyonunun büyük hücreli akciğer kanserinin bir prognostik faktörü olduğunu, bununla birlikte tümör derecesi, aşaması, türü ve TNM değerleri gibi klinik patolojik değerler ile bağlantılı olmadığını rapor etmişlerdir (186).

MDM2 p53 yolağının negative bir regülatörü olarak bilinmekte olup MDM2'nin aşırı ekspresyonu ya da amplifikasyonunun pek çok insan kanser tipinde sıklıkla gözlemlendiği bilinir ayrıca MDM2'nin aralarında retinoblastoma, p73, p14, p19 gibi diğer bazı tumor supressörlerle de ilişkili olduğu pek çok çalışmada öne sürülmüştür. Çalışmamızda ilk defa MDM2 SNP 309 ve p16 540C→G ile p16 580 C→T gen polimorfizmleri mide ve kolorektal kanserli hastalarda hastalığın riski ve prognostik parametreleri de göz önüne alınarak bir arada incelenmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre MDM2 SNP309 ve p16 540C→G kombine analizinde GTCC kombine genotipinin mide ve kolorektal kanserli hastalarda diğer combine genotiplere göre en yüksek frekansı gösterdiği ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu değer istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. MDM2 SNP309 ve p16 580C→T kombine genotip analiz sonucunda mide ve kolorektal kanserli hastalarda hastalığın riski ile genotip kombinasyonları arasında herhangi bir anlamlı veriye rastlanmamıştır.

Sonuç olarak;

1- Türk toplumunda p16 540C→G genotip dağılımı GG: %17,3 GC:%48 CC:%34,7 ve C allel frekansı %58,7, G allel frekansı ise %41,3 olarak saptanmıştır.

2- Türk toplumunda p16 580C→T genotip dağılımı TT: %4 CT: %24 CC:%72 ve T allel frekansı %16, C allel frekansı ise %84 olarak saptanmıştır.

3- Türk toplumunda MDM2 SNP 309 genotip dağılımı TT: %20 Gt:%49,3 GG:%30,7 ve T allel frekansı %44,7, G allel frekansı ise %55,3 olarak saptanmıştır.

4- p16 540C→G CCgenotipi ve C allel frekansı mide ve kolorektal kanserli hastalarda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Heterozigot olarak 540C→G genotipini taşıma durumu kolorektal kanserli hastalarda kontrol grubuna göre düşük olarak saptanmıştır.

5- p16 580C→T gen polimorfizmi açısından mide ve kolorektal kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

6- MDM2 SNP309 gen polimorfizmi hastalığın riski, klinik ve patolojik parametreleri açısından incelendiğinde gerek mide gerek kolorektal kanserli hastalarda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan bir anlamlılık göstermemiştir.

7- p16 540C→G gen polimorfizmi kolorektal kanserli hastalarda lenf nod metastaz varlığı açısından ele alındığında homozigot genotip taşımanın lenf nod pozitif hastalarda negative olan hastalara göre daha yüksek olması istatistiksel açıdan da anlamlı bulunmuştur.

8- Yapılan kombine genotip analizleri sonrasında p16 540C→G ve p16 580C→T kombine genotiplerinden CCCC kolorektal ve mide kanserli hasta gruplarında diğer tüm kombinasyonlara göre daha yüksek frekansta olup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark istatistiksel ileri düzeyde anlamlı bulundu. Ayrıca kontrol grubunda en yüksek frekansta olan GCCC kombine genotipi de kolorektal kanserli hastalarda istatistiksel anlamlı olarak düşük saptanmıştır.

9- MDM2 SNP309 ve p16 540C→G kombine genotip analizinde kolorektal kanserli hastalarda GTCC frekansının kontrol grubuna göre yüksek olması istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bulunurken, MDM2 SNP309 ve p16 580C→T kombinasyonun da gerek mide gerek kolorektal kanserli hastalarda kayda değer bir anlamlılık saptanmamıştır.

Çalışmamız p16 540C→G, 580C→T ve MDM2 SNP309 gen polimorfizmlerinin mide ve kolorektal kanserli hastalarda bir arada incelendiği orjinal bir

çalışmadır. Çalışmamızın p16 ve MDM2 genleri arasındaki olası etkileşimlere ışık tutacak çalışmalara destek vereceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Boland CR. *Textbook of gastroenterology*. 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1995.
2. Topuz E, Aykan NF. *Sindirim sistemi kanserleri*. 1st ed. İstanbul: Argos Yayıncılık; 1998.
3. Blot WJ. Esophageal cancer trends and risk factors. *Semin Oncol* 1994; **21**: 403-10.
4. Schrupp DS, Altorki NS. *Principles and practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001.
5. Parkin DM. International Variation. *Oncogene* 2004; **23**: 6329-40.
6. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*. New York; 1983.
7. Sandal T. Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer. *The Oncologist* 2002; **7**: 73-81.
8. Dirks PB, Rutka JT. Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle--a review. *Neurosurgery* 1997; **40**: 1013-1015.
9. Durmaz R, Vural M. Genetics in Primary and Secondary Glioblastoma. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 2007; **2**: 80-90.
10. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and cyclin dependent kinase inhibitors come of age. *Cell* 1994; **79**: 573-582.
11. Saltis J. TGF- β : receptors and cell cycle arrest. *Mol Cell Endocrinol* 1996; **116**: 227-232.
12. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994; **79**: 551-560.
13. Lam EWF, Lathangue NB. DP and E2F proteins-coordinating transcription with cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 859-866.
14. Vermeulen K, VanBockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle : a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; **36**: 131- 49.
15. Vermeulen K, Berneman ZN, VanBockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* 2003; **36**: 165-75.
16. Foster I. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography* 2008; **14**: 144-9.

17. Kearns WG, Liu JM. Cell cycle checkpoint genes and aneuploidy: A short review. *Curr Genomics* 2001; **2**: 171-80.
18. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene* 2006; **25**: 5220-7.
19. Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K, Syrjanen K. The p53 Tumor Suppressor Gene as a Common Cellular Target in Human Carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993; **88**: 174-86.
20. Bénard J, Douch-Rasy S, Ahomadegbe JC. TP53 Family Members and Human Cancers. *Hum Mutat* 2003; **21**: 182-91.
21. Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S, Bhoola K. Colon cancer: *genomics and apoptotic events*. *Biol Chem* 2004; **385**: 449-464.
22. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2005; **55**: 74-108.
23. Dunham LJ, Bailar JC. World maps of cancer mortality rates and frequency ratios. *J Natl Cancer Inst* 1968; **41**: 155-203.
24. Coit DG, Brennan MF. Gastric neoplasms. *Surg Treat of Digest Disease* 1990; **99**: 212-35.
25. Yaşa MH. Mide Kanserlerinde Epidemiyoloji. *Sendrom Tıp Derg* 1999; **11**: 92-94.
26. İlçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalin S, Süleymanlar G. *Temel iç Hastalıkları*. Ankara: Güneş Kitabevi; 1996.
27. Andreoli E, Charles CJ, Plum F. *Cecil essentials of medicine*. 1990.
28. Lavecchia C, Negri E, Franceschi S. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer* 1992; **70**: 50-5.
29. Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy AA, Hamilton SM. Gastric adenocarcinoma. *Ann Surg* 2005; **241**: 27-39.
30. <http://www.cancer.org/Cancer/StomachCancer/DetailedGuide/stomach-cancer-risk-factors> (Erişim tarihi: 26.08.10)
31. Wagner S, Beil W, Westermann J. Regulation of gastric epithelial cell growth by helicobacter pylori. *Gastroenterology* 1997; **113**: 1836 – 1847.
32. Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of H.Pylori. *Gastroenterol Clin N* 1993; **22**: 15-19.

33. Segal ED, Lange C, Covacci A, Tompkins LS, Falkow S. Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 7595-7599.
34. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Wathley L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; **388**: 539-547.
35. Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, DeJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; **397**: 176-180.
36. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997; **40**: 297-301.
37. Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun* 1990; **58**: 603-610.
38. Peek RM, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC, Blaser MJ. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest* 1995; **73**: 760-770.
39. Peek RM. *Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric mucosal cellular turnover: implications for carcinogenesis. *J Gastroenterol* 2002; **37 Suppl 13**: 10-16.
40. Everhart JE. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin N* 2000; **29**: 559-578.
41. Peek RM, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ, Miller GG. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a

- Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; **110**: 531-544.
42. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *Cancer J Clin* 1999; **49**: 78-80.
 43. Munoz N, Coirea P, Cuello C, Duque E. Histologic types gastric cancer in high and low risk areas. *Int J Cancer* 1968; **3**: 809-818.
 44. Kono S, Hiroto T. Nutrition and stomach cancer. *Cancer Cause Control* 1996; **7**: 41-55.
 45. Demirer TJ, Uzunalimoğlu O, Küçük O. Diet and Stomach cancer incidence. A case-control study in Turkey. *Cancer Inst.* 1990; **65**: 2344-48.
 46. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *Cancer J Clin* 1999; **49**: 78-80.
 47. Levine PH, Stemmermann GN, Lennette ET. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus prior to the diagnosis of Epstein-Barr associated gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1995; **60**: 642-644.
 48. Nakamura S, Deki T, Yao T. Epstein -Barr virus in gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Cancer* 1994; **73**: 2239-2249.
 49. Gunderson LL, Donohue JH, Burch AP. *Clinical oncology*. 2nd ed. 2000.
 50. Allum WH, Powell DJ, Mc Conkey CC, et al. *Gastric Cancer: a 25 year-review*. *Br J Surg* 1989; **76**: 535-540.
 51. Diehl JT, Hermann RE, Cooperman AM, Hoerr SO. *Gastric carcinoma: A ten-year review*. *Ann Surg* 1983; **198**: 9-12.
 52. Jackson JW. *The surgical management of malignant tumors of the cardia and esophagus*. *Br J Surg* 1979; Vol 66.
 53. Bloss R. *Carcinoma of the stomach in the young adult*. *Surg Gyn & Obst* 1980; Vol 50.
 54. Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. Frequent amplification of the *c-met* gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **189**: 227-232.
 55. Katoh M, Hattori Y, Sasaki H, Tanaka M, Sugano K, Yazaki Y, Sugimura T, Terada M. *K-sam* gene encodes secreted as well as transmembrane receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 2960-2964.

56. Yokota J, Yamamoto T, Miyajima N, Toyoshima K, Nomura N, Sakamoto H, Yoshida T, Terada M, Sugimura T. Genetic alterations of the c-erbB-2 oncogene occur frequently in tubular adenocarcinoma of the stomach and are often accompanied by amplification of the v-erbA homologue. *Oncogene* 1988; **2**: 283-287.
57. Oda N, Tsujino T, Tsuda T, Yoshida K, Nakayama H, Yasui W, Tahara E. DNA ploidy pattern and amplification of ERBB and ERBB2 genes in human gastric carcinomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1990; **58**: 273-277.
58. Yonemura Y, Ninomiya I, Ohoyama S, Kimura H, Yamaguchi A, Fushida S, Kosaka T, Miwa K, Miyazaki I, Endou Y. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma. Immunoreactivity for c-erbB-2 protein is an independent indicator of poor short-term prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1991; **67**: 2914-2918.
59. Lee KH, Lee JS, Suh C, Kim SW, Kim SB, Lee JH, Lee MS, Park MY, Sun HS, Kim SH. Clinicopathologic significance of the K-ras gene codon 12 point mutation in stomach cancer. An analysis of 140 cases. *Cancer* 1995; **75**: 2794-2801.
60. Sano T, Tsujino T, Yoshida K, Nakayama H, Haruma K, Ito H, Nakamura Y, Kajiyama G, Tahara E. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q, 5q, and 17p in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 1991; **51**: 2926-2931.
61. Isogaki J, Shinmura K, Yin W, Arai T, Koda K, Kimura T, Kino I, Sugimura H. Microsatellite instability and K-ras mutations in gastric adenomas, with reference to associated gastric cancers. *Cancer Detect Prev* 1999; **23**: 204-214.
62. Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitadai Y, Nishimura K, Todo H, Ayhan A, Yasui W, Ito H, Tahara E. p53 point mutations in primary human gastric carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; **119**: 67-70.
63. Sugimura T, Fujimura S, Baba T. Tumor production in the glandular stomach and alimentary tract of the rat by N-methyl- N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res* 1970; **30**: 455-465.
64. Mirvish SS. Kinetics of nitrosamide formation from alkylureas, N-alkylurethans, and alkylguanidines: possible implications for the etiology of human gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* 1971; **46**: 1183-1193.

65. Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P. Cloning of cDNA sequences of hormoneregulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 1982; **10**: 7895-7903.
66. Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 2004; **157**: 327-349.
67. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; **253**: 661-665.
68. Hayashi K, Yokozaki H, Goodison S, Oue N, Suzuki T, Lotan R, Yasui W, Tahara E. Inactivation of retinoic acid receptor beta by promoter CpG hypermethylation in gastric cancer. *Differentiation* 2001; **68**: 13-21.
69. Ito Y. Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. *Oncogene* 2004; **23**: 4198-4208.
70. Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, Lee M, Kim JW, Bang YJ, Kang GH. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest* 2004; **84**: 479-484.
71. Tamura G, Sakata K, Nishizuka S, Maesawa C, Suzuki Y, Iwaya T, Terashima M, Saito K, Satodate R. Analysis of the fragile histidine triad gene in primary gastric carcinomas and gastric carcinoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; **20**: 98-102.
72. Ono S, Oue N, Kuniyasu H, Suzuki T, Ito R, Matsusaki K, Ishikawa T, Tahara E, Yasui W. Acetylated histone H4 is reduced in human gastric adenomas and carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 2002; **21**: 377-382.
73. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Hofl er H. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 1994; **54**: 3845-3852.
74. Tucker EL, Pignatelli M. Catenins and their associated proteins in colorectal cancer. *Histol Histopathol* 2000; **15**: 251-260.
75. Handschuh G, Candidus S, Lubert B, Reich U, Schott C, Oswald S, Becke H, Hutzler P, Birchmeier W, Hofl er H, Becker KF. Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* 1999; **18**: 4301-4312.

76. Kawanishi J, Kato J, Sasaki K, Fujii S, Watanabe N, Niitsu Y. Loss of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion due to mutation of the beta-catenin gene in a human cancer cell line, HSC-39. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 1175-1181.
77. Caca K, Kolligs FT, Ji X, Hayes M, Qian J, Yahanda A, Rimm DL, Costa J, Fearon ER. Beta- and gamma-catenin mutations, but not E-cadherin inactivation, underlie T-cell factor/lymphoid enhancer factor transcriptional deregulation in gastric and pancreatic cancer. *Cell Growth Differ* 1999; **10**: 369-376.
78. Shibata T, Ochiai A, Kanai Y, Akimoto S, Gotoh M, Yasui N, Machinami R, Hirohashi S. Dominant negative inhibition of the association between beta-catenin and c-erbB-2 by N-terminally deleted beta-catenin suppresses the invasion and metastasis of cancer cells. *Oncogene* 1996; **13**: 883-889.
79. Yokozaki H, Ito R, Nakayama H, Kuniyasu H, Taniyama K, Tahara E. Expression of CD44 abnormal transcripts in human gastric carcinomas. *Cancer Lett* 1994; **83**: 229-234.
80. Akama Y, Yasui W, Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitahara K, Ishikawa T, Tahara E. Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1995; **86**: 617-621.
81. Yasui W, Kudo Y, Semba S, Yokozaki H, Tahara E. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1997; **88**: 625-629.
82. Yasui W, Naka K, Suzuki T, Fujimoto J, Hayashi K, Matsutani N, Yokozaki H, Tahara E. Expression of p27Kip1, cyclin E and E2F-1 in primary and metastatic tumors of gastric carcinoma. *Oncol Rep* 1999; **6**: 983-987.
83. Suzuki T, Yasui W, Yokozaki H, Naka K, Ishikawa T, Tahara E. Expression of the E2F family in human gastrointestinal carcinomas. *Int J Cancer* 1999; **81**: 535-538.
84. Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, Moslein G, Baker SM, Liskay RM, Burgart LJ, Honchel R, Halling KC. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 1996; **56**: 4836-4840.
85. Keller G, Grimm V, Vogelsang H, Bischoff P, Mueller J, Siewert JR, Hofler H. Analysis for microsatellite instability and mutations of the DNA mismatch repair gene hMLH1 in familial gastric cancer. *Int J Cancer* 1996; **68**: 571-576.

86. Yasui W, Tahara H, Tahara E, Fujimoto J, Nakayama J, Ishikawa F, Ide T, Tahara E. Expression of telomerase catalytic component, telomerase reverse transcriptase, in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1998; **89**: 1099-1103
87. Ito R, Kitadai Y, Kyo E, Yokozaki H, Yasui W, Yamashita U, Nikai H, Tahara E. Interleukin 1 alpha acts as an autocrine growth stimulator for human gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 1993; **53**: 4102-4106.
88. Yoshida K, Yokozaki H, Niimoto M, Ito H, Ito M, Tahara E. Expression of TGF-beta and procollagen type I and type III in human gastric carcinomas. *Int J Cancer* 1989; **44**: 394-398.
89. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/colon-andrectal> National Cancer Institute. Colon and rectal cancers. [Cited July 1, 2009.]
90. Skibber JM, Minsky BD, Hoff PM. *Cancer, principles and practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. 78.
91. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N England J Med* 1994; **331**: 1669-74.
92. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2002; **55**: 74-108.
93. Lynch HT, Smyrk TC et al. Genetics, natural history, tumor spectrum and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: An updated review. *Gastroenterology* 1993; **104**: 1535.
94. Lynch HT et al. *Current Therapy in Colon and Rectal Surgery*. Fazio VW ed. Philadelphia: BC Decker Publishing Company; 1990.
95. Steward BW, Kleihues P. Colorectal Cancer. *World Cancer Report*. Lyon: IARC Press; **2003**: 198-202.
96. Küpelioğlu AA. Kolorektal Kanserde Histopatoloji. Kolorektal Özel Sayısı, TürkiyeKlinikleri, *Journal of Surgery* 2004; **9**: 25-7.
97. Doğusoy G, Alemdaroğlu K, Akçal T, Buğra D. *Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları*. İstanbul: Türk Kolon ve Rektum Cerrahi Derneği; 2003.
98. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; **68**: 820-823.

99. Kuşakçıoğlu Ö. *Kolorektal Kanser Hastalıkları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2003.
100. Gönen Ö. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi, Kolorektal Özel Sayısı. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery* 2004; **9**: 57-65. 101.
101. <http://www.cancer.org/Cancer/ColonandRectumCancer/OverviewGuide/colorectal-cancer-overview-what-causes> (Erişim tarihi: 26.08.10)
102. Hardy RG, Meltzer SJ, Jankowski JA. ABC of colorectal cancer: Molecular basis for risk factors. *BMJ* 2000; **321**: 886-889.
103. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJC. The prognostic significance of K-ras, p53 and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 2005; April, Vol. 12, pp 586-1590.
104. Hardy RG, Meltzer SJ, Jankowski JA. ABC of colorectal cancer: Molecular basis for risk factors. *BMJ* 2000; **321**: 886-889.
105. Houlston RS. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol* 2001; **54**: 206-214.
106. Seignani C, Cranston A, Iozzo R, Fishel R, Calabretta B. Spontaneous and Mutagen-induced Transformation of Primary Cultures of Msh-2/-p53/- Colonocytes. *Cancer Res* 1999; **59**: 5882-5886.
107. Peinado M.A, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain rection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 10065-10069.
108. Yamada S, Ajioka Y, Watanabe H, Hashidate H, Takaku H, Kazama S, Yokoyama J, Nishikura K, Fujiwara T, Asakura H. Heterogeneity of p53 Mutational Status in Intramucosal carcinoma of the Colorectum. *Jpn. J. Cancer Res* 2001; **92**: 161-166.
109. Uchida H, Ando H, Maruyama K, Kobayashi H, Toda H, Ogawa H, Ozawa T, Matsuda Y, Sugimura H, Kanno T, Baba S. Genetic Alterations of Mixed Hyperplastic Adenomatous Polyps in the colon and Rectum. *Jpn J Cancer Res* 1998; **89**: 299-306.
110. Sheikh RA, Yasmeen S, Prindiville T. Biological Markers and Colorectal Cancer. *JK-Practitioner*, 2002; **9**: 215- 218.

111. Rashid A, Zahurak M, Goodman SN, Hamilton SR. Genetic epidemiology of mutated K-ras proto-oncogene, altered supreeor genes, and microsatellite instability in colorectal adenomas. *Gut* 1999; **44**: 826-833.
112. Adkison LR, Brown MD. *Cancer genetics*. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2007.
113. Kuwabara A, Watanabe H, Ajikoka Y, Yasuda K, Saito H, Matsuda K, Kijima H, Hatakeyama K. Alteration of p53 Clonality Accompanying Colorectal Cancer Progression. *Jpn J Cancer Res* 1998; **89**: 40-46.
114. Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S, Bhoola K. Colon cancer: genomics and apoptotic events. *Biol Chem* 2004; 385: 449-464.
115. Ay ME, Terzioğlu O, Terzi C, Ay Öİ. The detection of p21, p27, p57 cyclin dependent kinase inhibitor gene (CDKI) expression in colorectal cancer. *Akad Gastro Derg* 2006; **5**: 20-25.
116. Cobrinik D, Dowdy SF, Hinds PW, Mittnacht S, Weinberg RA. The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *Trends Biochem Sci* 1992; **17**: 312–5.
117. Besson A, Yong VW. Mitogenic signaling and the relationship to cell cycle regulation in astrocytomas. *J Neurooncol* 2001; **51**: 245- 264.
118. Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* 1996; **56**: 2405- 2410.
119. Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, Von DA, Louis DN. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 1996; **56**: 150- 153.
120. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; **55**: 4525–4530.
121. Ono Y, Yamiya T, Ichikawa T, Kunishio K, Matsumoto K, Furuta T, Ohmoto T, Ueki K, Louis DN. Malignant astrocytomas with homozygous CDKN2/p16 gene deletions have higher Ki–67 proliferation indices. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; **55**: 1026–1031.
122. Hegi ME, Zur HA, Ruedi D, Malin G, Kleihues P. Hemizygous or homozygous deletion of the chromosomal region containing the p16INK4a gene is associated

- with amplification of the EGF receptor gene in glioblastomas. *Int J Cancer* 1997; **73**: 57-63.
123. Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; **59**: 539- 543.
 124. Fombonne J, Devouassoux SM, Bouvier R, Droz JP, Benahmed M, Krantic S. Analysis of p16INK4A gene promoter in male germ-cell tumors: identification of a new point mutation. *Cancer Detect Prev* 2005; **29**: 1–7.
 125. Abbaszadegan MR, Raziee HR, Ghafarzadegan K, Shakeri MT, Afsharnezhad S, Ghavamnasiry MR. Aberrant p16 methylation, a possible epigenetic risk factor in familial esophageal squamouscell carcinoma. *Int J Gastrointest Cancer* 2005; **36**: 47–54.
 126. Debniak T, Scott RJ, Huzarski T, et al. CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. *Cancer Res* 2005; **65**: 835–9.
 127. McCloud JM, Sivakumar R, Greenhough A, et al. p16INK4a polymorphism: associations with tumour progression in patients with sporadic colorectal cancer. *Int J Oncol* 2004; **25**: 1447–52.
 128. Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 1986; **319**: 783 – 784.
 129. Uhrinova S, Uhrin D, Powers H. Structure of free MDM2 N-terminal domain reveals conformational adjustments that accompany p53-binding. *J Mol Biol* 2005; **350**: 587–98.
 130. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; **6**: 844–848.
 131. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999; **187**: 112-126.
 132. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; **358**: 80–83.

133. Piette J, Neel H, Marechal V. Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* 1997; **15**: 1001-1010.
134. Daujat S, Neel H, Piette J. MDM2: life without p53. *Trends Genet* 2001; **17**: 459-464.
135. Bond GL, Hu W, Bond EE. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 2004 **119**: 591-602.
136. Faur N, Araud L, Laroche CA, Kano J, Toutain J, Yamori T, Robert J, Le Morvan V. The association between the T309G polymorphism of the MDM2 gene and sensitivity to anticancer drug is dependent on the p53 mutational status in cellular models. *Br J Cancer* 2009; **101**: 350-356.
137. Schneider-Stock R, Radig K, Oda Y, Mellin W, Rys J, Neizabitowski A, Roessner A. p53 gene mutations in soft-tissue sarcomas: Correlations with p53 immunohistochemistry and DNA ploidy. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; **123**: 211-218.
138. Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M. Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1994; **54**: 794-799.
139. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 1215.
140. Yan L, Na W, Shan K, Xiao-Weiy M, Wei G, Shu-cheng C. p16(CDKN2) gene polymorphism: association with histologic subtypes of epithelial ovarian cancer in China. *Int J Gynecol Cancer* 2008; **18**: 30-35.
141. Ohmiya N, Taquchi A, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Goto H. MDM2 Promoter Polymorphism Is Associated With Both an Increased Susceptibility to Gastric Carcinoma and Poor Prognosis. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 4434-4440.
142. Yasui W, Sentani K, Motoshita J, Nakayama H. Molecular pathobiology of gastric cancer. *Scand J Surg* 2006; **95**: 225-31.
143. Shapiro GI, Park JE, Edwards CD, Mao L, Merlo A, Sidransky D, Ewen ME, Rollins BJ. Multiple mechanisms of p16ink4a inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1995; **55**: 6200-9.
144. Larre Borges A, Cuéllar F, Puig-Butillé JA, Scarone M, Delgado L, Badenas C, Milà M, Malvehy J, Barquet V, Núñez J, Laporte M, Fernández G, Levrero P,

- Martínez-Asuaga M, Puig S. CDKN2A mutations in melanoma families from Uruguay. *Br J Dermatol* 2009; **161**:1423.
- 145.Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, et al. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 1994; **8**: 23-6.
- 146.Scaini MC, Rossi E, de Siqueira Torres PL, Zullato D, Callegaro M, Casella C, Quaggio M, Agata S, Malacrida S, Chiarion-Sileni V, Vecchiato A, Alaibac M, Montagna M, Mann GJ, Menin C, D'Andrea E. Functional impairment of p16 (INK4A) due to CDKN2A p.Gly23Asp missense mutation. *Mutat Res* 2009; **671**: 26-32.
- 147.Ibarrola-Villava M, Fernandez LP, Pita G, Bravo J, Floristan U, Sendagorta E, Feito M, Avilés JA, Martin-Gonzalez M, Lázaro P, Benítez J, Ribas G. Genetic analysis of three important genes in pigmentation and melanoma susceptibility: CDKN2A, MC1R and HERC2/OCA2. *Exp Dermatol* 2010; **19**: 836-44.
- 148.Huber J, Ramos ES. The P48T germline mutation and polymorphism in the CDKN2A gene of patients with melanoma. *Braz J Med Biol Res* 2006; **39**: 237-41.
- 149.Kumar R, Smeds J, Berggren P, Straume O, Rozell BL, Akslen LA, Hemminki K. A single nucleotide polymorphism in the 3'untranslated region of the CDKN2A gene is common in sporadic primary melanomas but mutations in the CDKN2B, CDKN2C, CDK4 and p53 genes are rare. *Int J Cancer* 2001; **95**: 388-93.
- 150.Mantelli M, Barile M, Ciotti P, Ghiorzo P, Lantieri F, Pastorino L, Catricalà C, Torre GD, Folco U, Grammatico P, Padovani L, Pasini B, Rovini D, Queirolo P, Rainero ML, Santi PL, Sertoli RM, Goldstein AM, Bianchi-Scarrà G; Società Italiana Dermatologia; Gruppo Italiano Studi Epidemiologici in Dermatologia. High prevalence of the G101W germline mutation in the CDKN2A (P16(ink4a)) gene in 62 Italian malignant melanoma families. *Am J Med Genet* 2002; **107**: 214-21.

- 151.Kumar R, Lundh Rozell B, Louhelainen J, Hemminki K. Mutations in the CDKN2A (p16INK4a) gene in microdissected sporadic primary melanomas. *Int J Cancer* 1998; **75**: 193-8.
- 152.Holland EA, Beaton SC, Becker TM, Grulet OM, Peters BA, Rizos H, Kefford RF, Mann GJ. Analysis of the p16 gene, CDKN2, in 17 Australian melanoma kindreds. *Oncogene* 1995; **11**: 2289-94.
- 153.Chen J, Li D, Wei C, Sen S, Killary AM, Amos CI, Evans DB, Abbruzzese JL, Frazier ML. Aurora-A and p16 polymorphisms contribute to an earlier age at diagnosis of pancreatic cancer in Caucasians. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 3100-4.
- 154.Zheng Y, Shen H, Sturgis EM, Wang LE, Shete S, Spitz MR, Wei Q. Haplotypes of two variants in p16 (CDKN2/MTS-1/INK4a) exon 3 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2002; **11**:1511.
- 155.Sauroja I, Smeds J, Vlaykova T, Kumar R, Talve L, Hahka-Kemppinen M, Punnonen K, Jansén CT, Hemminki K, Pyrhönen S. Analysis of G(1)/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; **28**: 404-14.
- 156.Carén H, Erichsen J, Olsson L, Enerbäck C, Sjöberg RM, Abrahamsson J, Kogner P, Martinsson T. High-resolution array copy number analyses for detection of deletion, gain, amplification and copy-neutral LOH in primary neuroblastoma tumors: four cases of homozygous deletions of the CDKN2A gene. *BMC Genomics* 2008; **9**:353.
- 157.Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res.* 2005; **576**:22-38.
- 158.Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005; **24**: 2899–908.
- 159.Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 909–23.

160. Hu Z, Jin G, Wang L, Chen F, Wang X, Shen H. MDM2 promoter polymorphism SNP309 contributes to tumor susceptibility: evidence from 21 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; **16**: 2717-2723.
161. Atwal GS, Bond GL, Metsuyanin S, Papa M, Friedman E, Distelman-Menachem T, Ben Asher E, Lancet D, Ross DA, Sninsky J, White TJ, Levine AJ, Yarden R. Haplotype structure and selection of the MDM2 oncogene in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**:4524-4529.
162. Knappskog S, Lønning PE. MDM2 promoter SNP285 and SNP309; phylogeny and impact on cancer risk. *Oncotarget* 2011; **2**(3):251-8.
163. Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 2004; **119**:591-602.
164. Hong Y, Miao X, Zhang X, et al. The role of P53 and MDM2 polymorphisms in the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Can Res* 2005; **65**:9582-7.
165. Xu B, Xu Z, Cheng G, Min ZC, Mi Y, Zhang ZZ, Tao J, Li PC, Wang ML, Tang JL, Zhang ZD, Zhang W, Wu HF, Feng NH, Hua LX. Association between polymorphisms of TP53 and MDM2 and prostate cancer risk in southern Chinese. *Cancer Genet Cytogenet* 2010 Oct 15; **202**:76-81.
166. Stoehr R, Hitzenbichler F, Kneitz B, Hammerschmied CG, Burger M, Tannapfel A, et al. Mdm2-SNP309 polymorphism in prostate cancer: no evidence for association with increased risk or histopathological tumour characteristics. *Br J Cancer* 2008; **99**: 78e82.
167. Bond GL, Levine AJ. A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans. *Oncogene* 2007; **26**: 1317-23.
168. Bond GL, Hirshfield KM, Kirchhoff T, et al. MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormonedependent manner. *Cancer Res.* 2006; **66**:5104-10.

169. Bond GL, Menin C, Bertorelle R, Alhopuro P, Aaltonen LA, Levine AJ. MDM2 SNP309 accelerates colorectal tumour formation in women. *J Med Genet.* 2006; **43**: 950–2.
170. Mittelstrass K, Sauter W, Rosenberger A, Illig T, Timofeeva M, Klopp N, Dienemann H, Meese E, Sybrecht G, Woelke G, Cebulla M, Degen M, et al: Early onset lung cancer, cigarette smoking and the SNP309 of the murine double minute-2 (MDM2) gene. *BMC Cancer* 2008; **8**:113.
171. Liu G, Wheatley-Price P, Zhou W, Park S, Heist RS, Asomaning K, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC: Genetic polymorphisms of MDM2, cumulative cigarette smoking and nonsmall cell lung cancer risk. *Int J Cancer* 2008; **122**:915-8.
172. Pine SR, Mechanic LE, Bowman ED, Welsh JA, Chanock SC, Shields PG, Harris CC: MDM2 SNP309 and SNP354 are not associated with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; **15**:1559-61.
173. Hu Z, Ma H, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, Xu L, Wang X, Wei Q, Shen H: Genetic variants in the MDM2 promoter and lung cancer risk in a Chinese population. *Int J Cancer* 2006; **118**:1275-8.
- 174.9. Park SH, Choi JE, Kim EJ, Jang JS, Han HS, Lee WK, Kang YM, Park JY: MDM2 309T>G polymorphism and risk of lung cancer in a Korean population. *Lung Cancer* 2006; **54**:19-24.
175. Wilkening S, Bermejo JL, Hemminki K: MDM2 SNP309 and cancer risk: a combined analysis. *Carcinogenesis* 2007; **28**:2262-7.
176. Han JY, Lee GK, Jang DH, Lee SY, Lee JS: Association of p53 codon 72 polymorphism and MDM2 SNP309 with clinical outcome of advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2008; **113**:799-807.
177. Heist RS, Zhou W, Chirieac LR, Cogan-Drew T, Liu G, Su L, Neuberg D, Lynch TJ, Wain JC, Christiani DC: MDM2 polymorphism, survival, and histology in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; **25**:2243-7.

- 178.Chua HW, Ng D, Choo S, Lum SS, Li H, Soh LY, Sabapathy K, Seow A. Effet of MDM2 SNP 309 and p53 codon 72 polymorphisms on lung cancer risk and survival among non-smoking Chinese women in Singapore. *BMC Cancer* 2010; **10**:88.
- 179.Lum SS, Chua HW, Li H, Li WF, Rao N, Wei J, Shao Z, Sabapathy K: MDM2 SNP309 G allele increases risk but the T allele is associated with earlier onset age of sporadic breast cancers in the Chinese population. *Carcinogenesis* 2008; **29**:754-61.
- 180.Phang BH, Linn YC, Li H, Sabapathy K: MDM2 SNP309 G allele decreases risk but does not affect onset age or survival of Chinese leukaemia patients. *Eur J Cancer* 2008; **44**:760-6.
- 181.Li G, Zhai X, Zhang Z, Chamberlain RM, Spitz MR, Wei Q: MDM2 gene promoter polymorphisms and risk of lung cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis* 2006; **27**:2028-33.
- 182.Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 2004; **119**:591-602.
- 183.Duong V, Boulle N, Daujat S, Chauvet J, Bonnet S, Neel H, Cavailles V: Differential regulation of estrogen receptor alpha turnover and transactivation by Mdm2 and stress-inducing agents. *Cancer Res* 2007; **67**:5513-21.
- 184.32. Omoto Y, Kobayashi Y, Nishida K, Tsuchiya E, Eguchi H, Nakagawa K, Ishikawa Y, Yamori T, Iwase H, Fujii Y, Warner M, Gustafsson JA, et al: Expression, function, and clinical implications of the estrogen receptor beta in human lung cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **285**:340-7
- 185.Shinora A, Sakano S, et all. Association of tp53 and MDM' polymorphisms with survival in bladder cancer patients treated with chemoradiotherapy. *Cancer Scien* 2009; **12**: 2376-2382.

- 186.Ko JL, Cheng YW, Chang SL, Su JM, Chen CY, Lee H. MDM2 mRNA expression is a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 2000; **89**: 265–70.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI



İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 26/06/2009

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 7

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. İlhan YAYLIM ERALTAN'ın üstlendiği ve Moleküler Tıp Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Biyolog Gülay TUNA'nın yürüteceği 2009/1977 protokol numaralı " Mide ve Kolorektal Kanseri Hastalarda p16, MDM2 Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi" başlıklı tez çalışması kurulumuzda incelendi.

Etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklendiği takdirde uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Güher SARUHAN DİRESKENELİ

Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL

İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN

Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Kamii PEMBEÇİ

Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM

Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN

Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP

I.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK

İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER

Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK

Hukukçu

Prof.Dr. Y. Sumer YAMANER

Genel Cerrahi A.D.

PATENT HAKKI İZİNİ

TELİF HAKKI İZİNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gülay	Soyadı	Tuna
Doğ. Yeri	Bursa	Doğ.Tar.	27.01.1986
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	34120163628
Email	tuna_gulay@hotmail.com	Tel	0544 855 67 10

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi DETAE Moleküler Tıp ABD.	
Lisans	Uludağ Üniversitesi	2008
Lise	Özel Nilüfer Eğitim Kurumları	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Kayak kaymak, yüzmek, gezmek, kitap okumak.