

**T.C**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TÜRK POPULASYONUNDA GASTROİNTESTİNAL SİSTEM KANSER  
OLGULARINDA FOSFATİDİLİNOSİTOL-3-KİNAZ KATALİTİK ALFA  
(PIK3CA) GEN MUTASYONLARI VE METİLENTETRAHİDROFOLAT  
REDÜKTAZ (MTHFR) C677T POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Özge ÖZCAN**

**Balıkesir, Temmuz-2009**

**T.C**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TÜRK POPULASYONUNDA GASTROİNTESTİNAL SİSTEM KANSER  
OLGULARINDA FOSFATİDİLİNOSİTOL-3-KİNAZ KATALİTİK ALFA  
(PIK3CA) GEN MUTASYONLARI VE METİLENTETRAHİDROFOLAT  
REDÜKTAZ (MTHFR) C677T POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Özge ÖZCAN**

**Balıkesir, Temmuz-2009**

T.C  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TÜRK POPULASYONUNDA GASTROİNTESTİNAL SİSTEM KANSER  
OLGULARINDA FOSFATİDİLİNOSİTOL-3-KİNAZ KATALİTİK ALFA  
(PIK3CA) GEN MUTASYONLARI VE METİLENTETRAHİDROFOLAT  
REDÜKTAZ (MTHFR) C677T POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özge ÖZCAN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR

İkinci Danışman : Prof. Dr. Leyla AÇIK

Sınav Tarihi: 10.08.09

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı) (BAÜ)

Prof. Dr. Oktay ARSLAN (BAÜ)

Doç. Dr. Selma SİNAN (BAÜ)

Balıkesir, Temmuz-2009

## ÖZET

# TÜRK POPULASYONUNDA GASTROİNTESTİNAL SİSTEM KANSER OLGULARINDA FOSFATİDİLİNOSİTOL-3-KİNAZ KATALİTİK ALFA (PIK3CA) GEN MUTASYONLARI VE METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR) C677T POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ

Özge ÖZCAN

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi \ Tez Danışmanı: Doç. Dr. Feray Köçkar)

(İkinci Danışman: Prof. Dr. Leyla Açık)

Balıkesir,2009

Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) ve Fosfatidilinositol-3-kinaz katalitik alfa (PIK3CA) genlerinin ikisi de gastrointestinal sistem kanserleri ile bağlantılı bulunmaktadır. MTHFR tek karbon metabolizmasında bir anahtar enzimdir. Özellikle MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri mide kanseri ve kolon kanseri ile bağlantılı bulunmuştur. PIK3CA fosfatidilinositol-3-kinazın katalitik alt birimi p110 $\alpha$ 'yı kodlar. Artmış fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) aktivitesine bağlı olarak geniş farklılıklarda tümörlerde PIK3CA mutasyonları gözlemlenmektedir.

Çalışmamızda periferik kan örnekleri 103 Gastrointestinal sistem (GİS) kanserli (38 kolorektal, 29 mide, 15 pankreas ve 21 karaciğer) ve 105 kontrol grubu bireyden temin edilmiştir. Bu örneklerden DNA izolasyonu yapılmıştır. MTHFR 677. bç. bölgesi ve PIK3CA 21. ekzon bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. MTHFR C677T varyantları RFLP (Restriksiyon Fragment Uzunluk

Polimorfizmi) yöntemi ile belirlenmiştir. Buna göre 677CC, 677CT ve 677TT frekansları GİS kanserli olgularda 54(%52,4), 45(%43,7) ve 4(%3,9) ve kontrol grubunda 52(%49,5), 40(%38) ve 13(%12,4) olarak belirlenmiştir. 70 GİS kanserli örnek için PIK3CA'nın çoğaltılan bölgesinin dizi analizi, otomatik dizi analizi ile çıkarılmıştır. Çalışılan örneklerin mutasyon durumları ilgili dizilerin iliki karşılaştırmaları yapılarak sunulmuştur. PIK3CA geninin 21. ekzon bölgesinde her hangi nükleotit polimorfizmi bulunamamıştır.

Anahtar Sözcükler: MTHFR \ PIK3CA \ gastrointestinal \ kanser \ mutasyon

## ABSTRACT

# ANALYSIS OF PHOSPHATIDYLINOSITOL-3-KINASE CATALYTIC ALFA (PIK3CA) GENE MUTATIONS AND METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (MTHFR) C677T POLYMORPHISMS IN GASTROINTESTINAL CANCER CASES IN TURKISH POPULATION

**Özge ÖZCAN**

**Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology**

(MSc. Thesis / Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Feray KÖÇKAR)

(Cosupervisor : Prof. Dr.Leyla AÇIK)

Balıkesir-Turkey, 2009

Both the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and Phosphatidylinositol-3-kinase catalytic alfa (PIK3CA) genes are associated with gastrointestinal system cancers. MTHFR is a key enzyme in one-carbon metabolism. Especially MTHFR C677T and A1298C polymorphisms has been linked to gastric and colon cancers. Phosphatidylinositol -3- kinase catalytic alfa (PIK3CA) encodes the catalytic subunit p110 $\alpha$  of phosphatidylinositol kinases (PI3K). A wide variety of tumours show PIK3CA mutations leading to increased PI3K activity.

In our study, peripheral blood samples were obtained from 103 Gastrointestinal (GIS) cancer (38 colorectal, 29 stomach, 15 pancreas and 21 liver cancers) cases and 105 healthy controls. DNA was extracted from these samples. 677 bp region of MTHFR and exon 21 of PIK3CA were amplified by polymerase chain reaction. MTHFR 677C $\rightarrow$ T, variant alleles were determined by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) assay. Frequencies of MTHFR 677CC, 677CT and 677TT genotypes were 54(%52,4), 45(%43,7) and 4(%3,9) in the GIS cancer's cases and 52(%49,5), 40(%38) and 13(%12,4) in the controls. The

sequences of the amplified regions for PIK3CA for 70 GIS cancer cases were determined by automated-sequencing. The mutations statues of the samples were determined through bioinformatics analyses by performing the multiple alignments of the related sequences. No nucleotide polymorphism were found at PIK3CA exon 21.

Keywords: MTHFR \ PIK3CA \ gastrointestinal \ cancer \ mutation

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER .....	vi
SEMBOL LİSTESİ .....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
ÖNSÖZ.....	xiii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Kanser .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Kanserın Tanımı ve Moleküler Temelleri .....	3
1.1.2 Hücre Döngüsü ve Kanser.....	8
1.1.3 Onkogenler .....	13
1.1.4 Tümör Baskılayıcı Genler .....	15
<b>1.2 Gastrointestinal Sistem Kanserleri.....</b>	<b>18</b>
1.2.1 Mide Kanserı .....	18
1.2.1.1 Epidemiyoloji.....	18
1.2.1.2 Risk faktörleri. ....	19
1.2.1.3 Patoloji .....	20
1.2.2 Kolon Kanserı.....	21
1.2.2.1 Epidemiyoloji:.....	21
1.2.2.2 Risk faktörleri .....	24
1.2.2.3 Patolojisi.....	24
1.2.3 Karaciğer Kanserı.....	25
1.2.3.1 Epidemiyoloji:.....	25
1.2.3.2 Risk faktörleri .....	26
1.2.3.3 Patoloji .....	27
1.2.4 Pankreas Kanserı .....	27
1.2.4.1 Epidemiyoloji.....	27

1.2.4.2 Risk faktörleri .....	27
1.2.4.3 Patolojisi: .....	28
<b>1.3 Gastrointestinal Sistem Kanserlerinde Gözlenen Onkogenler .....</b>	<b>28</b>
1.3.1 MTHFR (Metilen Tetra Hidrofolat Redüktaz) .....	28
1.3.1.1 MTHFR Polimorfizmleri ve Hastalıklarla İlişkisi .....	30
1.3.1.2 MTHFR'nin Farklı Populasyonlarda Gözlemlenmesi .....	34
1.3.2 PIK3CA (Fosfatidilinositol-3-Kinaz Katalitik Alfa).....	35
1.3.2.1 PI3K (Fosfatidilinositol Kinazlar).....	35
1.3.2.2 PIK3CA (Fosfatidil İnositol 3 Kinaz Katalitik Alfa) Geni .....	37
1.3.2.3 PI3K\AKT Sinyal İletim Yolu .....	39
<b>1.4 Mutasyon Analizlerinde Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler ...</b>	<b>42</b>
1.4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	42
1.4.2 Agaroz Jel Elektrofezi .....	45
1.4.3 DNA Dizi Analizi.....	47
<b>1.5 Çalışmanın Amacı .....</b>	<b>50</b>
<b>2. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>51</b>
<b>2.1 Materyal.....</b>	<b>51</b>
2.1.1 Kan Örneklerinin Toplanması .....	51
2.1.2 Kimyasallar.....	52
2.1.2.1 Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar.....	52
2.1.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler ...	52
2.1.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler.....	53
2.1.2.4 Hinf 1 ile kesim için Gerekli Kimyasallar .....	53
2.1.3 Laboratuvar Gereçleri.....	54
<b>2.2 Metot .....</b>	<b>55</b>
2.2.1 DNA İzolasyonu .....	55
2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	56
2.2.3 Jel Elektroforezi.....	56
2.2.4 Restriksiyon Endonükleaz Analizi .....	57
2.2.5 Dizi Analizi .....	57
2.2.6 Biyoinformatik Analizi.....	58
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 PIK3CA Proto-onkogeninin 21. Ekzon Bölgesine Ait PCR ve DNA Dizi Analizi Sonuçları .....</b>	<b>60</b>

<b>3.2 MTHFR Proto-onkogeninin C677T Bölgesinin RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi.....</b>	<b>64</b>
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>70</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>75</b>
<b>5. KAYNAKLAR .....</b>	<b>90</b>

## SEMBOL LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
$\mu$ l	Mikrolitre
AKT	Protein kinaz B
ASV16	Avian Retro Virüs
BAD	Bcl2 Hücre Ölümü Karşıtı Protein
bç	Baz çifti
CAK	Siklin Bağımlı Kinaz Aktive Edici Kinaz
CCC	Kolanjiyoselüler Karsinom
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CGH	Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
CT	Bilgisayarlı Tomografi
Cyc=cln	Siklin
DHF	Dihidrofolat
DMS	Dimetil Sülfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleozit Trifosfat
ddNTP	Dideoksiribonükleozit Trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERCP	Endoskopik Retrograd Kolanjiyo Pankreatografi
FAD	Flavin Adenin Dinükleotit
FAP	Ailesel Polipozis Koli
FASN	Yağ Asidi Sentetaz
HBV	Hepatit B Virüsü
HCC	Hepatoselüler Kanser
HCl	Hidroklorik Asit
HCV	Hepatit C Virüsü
HNPCC	Ailesel Non Polipozis Kolon Kanseri
IGFR	Trombositten Türemiş Tüyüme Faktörü Reseptörü
IIAB	İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi
Kb	Kilo Baz
kDa	Kilo Dalton
ml	Mili Litre

mM	Mili Molar
MR	Manyetik Rezonans
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MTHFR	Metilentetrahidrofolat Redüktaz
mTOR	Memeli Rapamisin Hedefi
NCBI	Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Merkezi
°C	Santigrat Derece
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	Plateled Derived Büyüme Faktörü
PDK	PIP3 Bağımlı Kinaz
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinaz
PIK3CA	Fosfatidilinositol-3-kinaz katalitik alfa
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate
PJS	Peutz-Jeghers Sendromu
PKB	Protein Kinaz B
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homologu
RBC	Eritrosit Parçalama Tamponu
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
rpm	Dakikada dönüş sayısı
SAM	S-adenozilmetiyoninin
STE	Sodyum Klorid Tris EDTA
TAE	Tris Asetat Edta
TE	Tris Edta
TGFβ	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
THF	Tetrahidrofolat
US	Ultrasonografi
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Sık Rastlanan Hastalıklar ve Ölüm Sebepleri .....	4
Şekil 1.2 Hücre Döngüsü .....	9
Şekil 1.3 Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi ve Siklin Bağımlı Kinazlar .....	10
Şekil 1.4 Hücre Döngüsü ve Kontrol Noktaları .....	12
Şekil 1.5 Retinoblastoma Proteini ile G1'den S'e Geçişin Düzenlenmesi .....	17
Şekil 1.6 Gastrik Karsinogenez .....	20
Şekil 1.7 Kolon Karsinogenezi .....	22
Şekil 1.8 Kolon Hastalıkları Oranları .....	23
Şekil 1.9 MTHFR (Metilentetrahidrofolat redüktaz) Geninin Lokalizasyonu .....	29
Şekil 1.10 MTHFR (Metilen tetra hidrofolat redüktaz) Metabolizması .....	30
Şekil 1.11 MTHFR (Metilentetrahidrofolat redüktaz) 677C\T Polimorfizmi .....	31
Şekil 1.12 PI3K İzofomları .....	36
Şekil 1.13 PIK3CA'nın Lokalizasyonu .....	37
Şekil 1.14 PIK3CA'daki (Fosfatidil İnositol 3 Kinaz Katalitik Alfa) Sıklıkla Karşılaşılan Mutasyonlar .....	38
Şekil 1.15 PIK3CA (Fosfatidilinositol-3-Kinaz Katalitik Alfa) .....	38
Şekil 1.16 PI3K\AKT Sinyal İletim Yolu .....	41
Şekil 1.17 (PCR) Polimeraz Zincir Reaksiyonu Cihazı .....	44
Şekil 1.18 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Sıcaklık Değişimleri .....	45
Şekil 1.19 Agaroz Jel Elektroforezi Cihazı .....	46
Şekil 1.20 Agaroz Jel Elektroforezi Jel Görüntüsü .....	47
Şekil 1.21 Dizi Analizi Yöntemlerinin Karşılaştırılması .....	49
Şekil 3.1 PIK3CA PCR Ürünü Jel Görüntüsü .....	63
Şekil 3.2 14. Olguya Ait BLAST Analizi Görüntüsü .....	64
Şekil 3.3 PCR-RFLP Analizi .....	65
Şekil 3.4 MTHFR PCR Ürünü jel Görüntüsü .....	66
Şekil 3.5 MTHFR PCR Ürünlerinin Hinfl Enzimi ile Kesildikten Sonraki Jel Görüntüsü .....	67

## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1	Dünya Sağlık Örgütü 2008 Kanser Raporunda 2008 Yılında TahminEdilen Yeni Vakalar.	5
Çizelge 1.2	Dünya Sağlık Örgütü 2008 Kanser Raporunda 2008 Yılında Tahmin Edilen Ölüm Oranları .....	5
Çizelge 1.3	İç ve Dış Kaynaklı Kanserojenler .....	6
Çizelge 1.4	Bazı Onkogenler .....	14
Çizelge 1.5	Karaciğer Metastazı Görülen Primer Tümör Sıklıkları.....	26
Çizelge 2.1	Laboratuvar Gereçleri .....	54
Çizelge 3.1	PIK3CA Polimorfizm Analizinde Çalışılan Hastalar .....	59
Çizelge 3.2	MTHFR Polimorfizm Analizinde Çalışılan Hasta ve Kontrol Grubu .	60
Çizelge 3.3	PIK3CA ekzon 21 Bölgesinin Çoğaltılması İçin Kullanılan Primerler, Bağlanma Sıcaklıkları ve PCR Ürünlerinin Büyüklükleri.....	61
Çizelge 3.4	PIK3CA Ekzon 21 in Çoğaltılması için Kullanılan PCR programı.....	61
Çizelge 3.5	PIK3CA mRNA Dizisi, Kullanılan Primerlerin Yerleşim Bölgeleri (Pembe ile Gösterilen), Çoğaltılan Bölge (Mavi ile Gösterilen). Gen Kayıt numarası:NM_006218.....	62
Çizelge 3.6	MTHFR Geninin Çoğaltılması için Kullanılan Primerler.....	65
Çizelge 3.7	MTHFR Geninin Çoğaltılması için Kullanılan PCR Programı .....	65
Çizelge 3.8	MTHFR 677C\T Polimorfizminin Kanserli Olgular ve Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması .....	69

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışmanın tüm deneyleri Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiş olup, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Feray KÖÇKAR ve Gazi Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Leyla AÇIK danışmanlığında sonuçlanmıştır.

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde her türlü desteği sağlayan tez danışmanlarım Sayın Prof. Dr. Leyla Açıık ve Sayın Doç. Dr. Feray Köçkar'a

Çalışmam süresince gerekli materyalleri temin etmemde yardımcı olan; Ankara Numune Araştırma ve Eğitim Hastanesi Başhekimisi Sayın Prof. Dr. Mahmut Koç'a, Ankara Etlik İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Klinik Şefi Sayın Doç. Dr. Mehmet Kılıç'a, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Mehmet Cindoruk ile Sayın Dr. Eyüp Ekici'ye

Çalışmalarım boyunca dostluk ve desteklerini esirgemeyen Ceren Çimen'e ve Balıkesir Üniversitesi ve Gazi Üniversitesindeki laboratuvar arkadaşlarıma

Hayatımın her anında yanımda olan ve güvenlerini, desteklerini ve inançlarını esirgemeyen canım ailem; annem Emine İnan, babam Aptullah İnan ve babaannem Esmâ İnan'a ve sevgili eşim Murat Olcay Özcan'a

En içten teşekkürlerimi sunuyorum.

**Balıkesir, 2009**

**Özge ÖZCAN**

## 1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalarak diğer doku ve organlara yayılması ile karakterize edilen bir hastalıktır [1]. Kanser, sık görülmesi yanında ölüm oranlarının yüksek olması ve tedavinin maliyeti, süresi ve yan etkileri nedeniyle günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. Kanser, türüne, coğrafi bölgelere, hasta yaşı ve cinsiyetine göre farklılıklar göstermektedir [2].

Türkiye’de kansere bağlı ölümler enfeksiyon hastalıklarındaki gerilemenin etkisiyle 1990 yılından itibaren kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ikinci sıraya yükselmiştir [3]. Gastrointestinal sistem kanserleri (GİS) kanser ölümlerinin ilk üç sırası içerisinde, erkeklerde akciğer, kadınlarda akciğer ve meme kanserlerinden sonra yer almaktadır [4]. Ülkemizde ve dünyanın birçok yerinde, sindirim sisteminin en sık rastlanan kanser türü mide kanseri olarak belirtilmektedir [5, 6].

5,10-Metilentetrahidrofolat redüktaz proteinini şifreleyen gen MTHFR’dir [7]. 1. kromozomun p kolunun 36.3. bandında bulunmaktadır. Gen 150 kD’luk, 656 amino asitten oluşan homodimerik bir proteini şifreler. İnsanda MTHFR geni 11 ekzondan oluşur [8,9].

MTHFR folat metabolizmasında anahtar enzim rolündedir. Enzim folat koenzimlerinin pürin, pirimidin sentezi ve metiyonin sentezi için paylaşımını sağlayarak organizmanın fizyolojik fonksiyonlarında düzenleyici görev alır. MTHFR 5,10 metilentetrahidrofolatın, 5-metiltetrahidrofolata indirgenmesini katalizler [10].

MTHFR aktivitesinin DNA metilasyonu, DNA tamiri ve DNA sentezindeki potansiyel etkisi MTHFR'yi kanser etkileyici gen yapmıştır [11]. MTHFR geninin 677. bç'de C\T değişmesi ile tanımlanan ve enzim aktivitesinde %60 azalmaya sebep olan bir polimorfizm tanımlanmıştır. C677T polimorfizmine bağlı olarak meydana gelen indirgenmiş MTHFR aktivitesi vasküler hastalıklar, nöral tüp defekti, erkek infertilitesi, down sendromu gibi farklı hastalıklarla da bağlantılı bulunmuştur [12].

Fosfatidilinositol 3-kinazlar (PI3K) , hücre çoğalmasında yer alan sinyal iletim yolları, hayatta kalma, hücre ölümü, farklılaşma, hücreyel iskeletin yeniden ayarlanması ve hücreler arası trafiği düzenleyen lipid kinaz ailesidir [13].

PIK3CA fosfatidilinositol-3-kinazın katalitik alt birimini kodlayan gendir [14]. Genin 3q26.3 de bulunduğu tespit edilmiştir [15]. Gen 21 ekzondan oluşur ve 1068 aminoasitten oluşan 124kDa'luk proteini kodlar. Kolon, meme, beyin, karaciğer, mide ve akciğer kanseri gibi birçok kanser tipinde bu gene ait gen çoğalmaları, delesyonları ve daha sıklıkla somatik (yanlış anlamlı) missense mutasyonlar tanımlanmıştır [16,17].

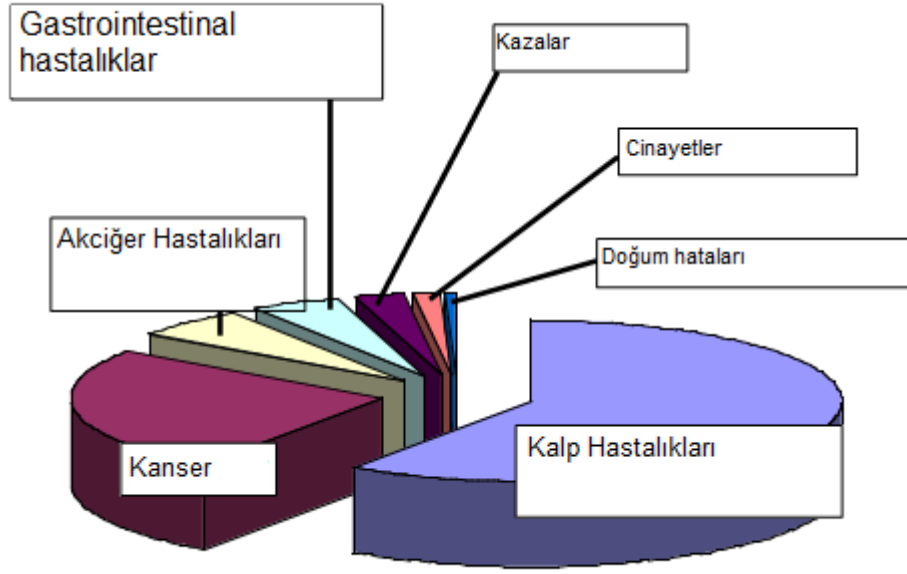
Bu tez çalışmasında farklı tiplerde gastrointestinal sistem kanserli olgudan ve kontrol grubundan elde edilen DNA örneklerinde MTHFR ve PIK3CA genlerindeki mutasyonların tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için elde edilen DNA örneklerinin istenilen bölgeleri uygun primerler ile çoğaltılmış ve MTHFR için RFLP ve PIK3CA için dizi analizi yöntemleri ile mutasyon analizleri yapılmıştır. Tespit edilen mutasyonların gastrointestinal sistem kanserleri ile bağlantısının araştırılması hedeflenmiştir.

## **1.1 Kanser**

### **1.1.1 Kanserin Tanımı ve Moleküler Temelleri**

Kanser, gen ekspresyonunda meydana gelen çoklu değişiklikler sonucu hücrelerdeki anormal büyüme olarak tanımlanır. Hücre ölümü ve çoğalmasında dengesizlik yaratır ve eninde sonunda bir hücre popülasyonuna yayılarak dokuları istila eder. Metastaz yaparak uzak bölgelere yayılır ve önemli rahatsızlıklara sebep olur. Eğer tedavi edilmezse ölümlerle sonuçlanır [18]. Kanseri, sık görülmesi yanında ölüm oranının yüksek olması ve tedavinin maliyeti, süresi ve yan etkileri nedeniyle günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. Kanseri, türüne, coğrafi bölgelere, hasta yaşı ve cinsiyetine göre farklılıklar göstermektedir [2].

Yapılan istatistiksel çalışmalar, kanserin toplumun yaklaşık üçte birinden fazlasında görüldüğünü, ölümlerin yüzde yirmisinden fazlasından sorumlu olduğunu ve gelişmiş ülkelerin toplam sağlık harcamalarının yaklaşık yüzde onundan fazlasının kanser tedavileri harcamalarının oluşturduğunu göstermiştir (Çizelge 1.1, çizelge 1.2) [19]. Türkiye’de kansere bağlı ölümler enfeksiyon hastalıklarındaki gerilemenin de etkisiyle 1990 yılından itibaren kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ikinci sıraya yükselmiştir (Şekil 1.1) [3].



Şekil 1.1 Sık Rastlanan Hastalıklar ve Ölüm Sebepleri [18].

Kanser, Türkiye'de 1982 yılında 1593 sayılı Umumi Hıfzısıhha Kanunu'nun 57. Maddesi gereğince "Bildirimi Zorunlu Hastalıklar" listesine alınmış olmasına rağmen ülkemizde gerçek kanser insidansı hiç bilinmemektedir [20].

Çizelge 1.1 Dünya Sağlık Örgütü 2008 Kanser Raporunda 2008 Yılında Tahmin Edilen Yeni Vakalar [21].

<b>ERKEKLER</b>	<b>Birey Sayısı</b>	<b>Yüzde</b>	<b>KADINLAR</b>	<b>Birey Sayısı</b>	<b>Yüzde</b>
<b>Prostat</b>	186,320	%25	<b>Meme</b>	182,460	%26
<b>Akciğer</b>	114,690	%15	<b>Akciğer</b>	100,330	%14
<b>Kolorektal</b>	77,250	%10	<b>Kolorektal</b>	71,560	%10
<b>İdrar torbası</b>	51,230	%7	<b>Rahim</b>	40,100	%6
<b>Non-Hodgkin lenfoma</b>	35,450	%5	<b>Non-Hodgkin lenfoma</b>	30,670	%4
<b>Cilt</b>	34,490	%5	<b>Tiroid</b>	28,410	%4
<b>Böbrek</b>	33,130	%4	<b>Cilt</b>	27,530	%4
<b>Ağız, farinks</b>	25,310	%3	<b>Ovaryum</b>	21,650	%3
<b>Lösemi</b>	25,180	%3	<b>Böbrek</b>	21,260	%3
<b>Pankreas</b>	18,770	%3	<b>Lösemi</b>	19,090	%3
<b>Tüm bölgeler</b>	601,820	%100	<b>Tüm bölgeler</b>	692,000	%100

Çizelge 1.2 Dünya Sağlık Örgütü 2008 Kanser Raporunda 2008 Yılında Tahmin Edilen Ölüm Oranları [21].

<b>ERKEKLER</b>	<b>Birey Sayısı</b>	<b>Yüzde</b>	<b>KADINLAR</b>	<b>Birey Sayısı</b>	<b>Yüzde</b>
<b>Akciğer</b>	90,810	%31	<b>Akciğer</b>	71,030	%26
<b>Prostat</b>	28,660	%10	<b>Meme</b>	40,480	%15
<b>Kolorektal</b>	24,260	%8	<b>Kolorektal</b>	25,700	%9
<b>Pankreas</b>	17,500	%6	<b>Pankreas</b>	16,790	%6
<b>Karaciğer</b>	12,570	%4	<b>Ovaryum</b>	15,520	%6
<b>Lösemi</b>	12,460	%4	<b>Non-Hodgkin lenfoma</b>	9,370	%3
<b>Özefagus</b>	11,250	%4	<b>Lösemi</b>	9,250	%3
<b>İdrar torbası</b>	9,950	%3	<b>Üterine korpus</b>	7,470	%3
<b>Non-Hodgkin lenfoma</b>	9,790	%3	<b>Karaciğer</b>	5,840	%2
<b>Böbrek</b>	8,100	%3	<b>Beyin</b>	5,650	%2
<b>Tüm bölgeler</b>	294,120	%100	<b>Tüm bölgeler</b>	271,530	%100

İnsan kanserlerinde karsinogenez mekanizması oldukça karmaşık ve çok faktörlüdür. Kansere sebep olan ajanlara *karsinojen* denir. Dış kaynaklı karsinojenleri 3 sınıf altında toplayabiliriz (Çizelge 1.3) [22].

Çizelge 1.3 İç ve Dış Kaynaklı Kanserojenler [22].

<b>Kanserojen tipi</b>		<b>Örnek</b>
<b>Dış Kaynaklı Kanserojen</b>	<b>Kimyasal Kanserojenler</b>	Nikel, kadmiyum, arsenik, nitrozaminler, arilaminler, trikloroetilen, aflatoksinler, reaktif oksijen türleri vb.
	<b>Fiziksel Kanserojenler</b>	UV ışın, iyonize radyasyon vb.
	<b>Biyolojik Kanserojenler</b>	Human Pappiloma virüs, Eppstein Barr virüs, Helicobacter Piloni , Hepatit virüsü vb.
<b>İç Kaynaklı Kanserojen</b>		DNA replikasyonu, reaktif oksijen türleri üreten metabolik reaksiyonlar, kronik inflamasyon vb.

Kanser tek bir hastalık olmayıp, daha çok kitle ya da tümör oluşumuna yol açtığını bildiğimiz kontrolsüz hücre çoğalması ile karakterize edilen *neoplazinin* daha kesin formlarını tanımlamak için kullanılır. Bununla birlikte neoplazinin kanser olabilmesi için malin özellik göstermesi, bir başka deyişle kontrolsüz büyümesi, komşu dokuları istila edebilmesi ve yakın-uzak mesafelere yayılabilme (*metastaz*) özelliğine sahip olması gerekmektedir. Tümörler metastaz yapmıyorlarsa kanseröz değildir ve bu durumda, benin olarak adlandırılırlar [19,23,24].

Kanser tiplerinin adlandırılmasında ön ek oma- bir doku tipine eklendiğinde o dokunun benin tümörünü ifade eder. Bazı malin neoplasiler de bu şekilde adlandırılabilir: lenfoma ve melanoma gibi. Malignant tümörler epitelyum kökenli

ise karsinoma, mezenşimal kökenli ise sarkoma terimlerinin, köken aldığı dokuya eklenmesi ile ifade edilir. Buna örnek olarak memede adenokarsinoma, akciğerde pullu hücre karsinomu, deride bazal hücre karsinomu verilebilir. Çoğu insan malignansisi epitel dokudan köken alır. Bunlardan, pullu tabakalı epitel dokudan köken alanlar pullu hücre karsinomu, bez epitelinden köken alanlar ise adenokarsinoma olarak adlandırılır. Eğer malignant tümör köken aldığı dokuya benzememeye başlarsa anaplastik ya da farklılaşmamış olarak adlandırılır [18].

Kanserin esas olarak üç tipi vardır: Kemik, kas ya da konnektif doku gibi mezenşimal dokulardan kaynaklanan sarkomalar; barsak mukozası, bronşlar ve meme duktusları gibi epitelyal dokudan kaynaklanan karsinomalar; kemik iliği, lenfatik sistem ve periferik kan boyunca yayılan lösemi ve lenfoma gibi hemapoetik ve lenfoid malignansilerdir. Bu tümörlerin her biri yerleşim yerine, doku tipine, histolojik yapısına ve malignansinin derecesine göre de sınıflandırılmaktadır [18,19].

Anormal hücre birikimi olan neoplazi, hücreyel çoğalma ile hücreyel yok oluş arasındaki dengesizlik nedeniyle oluşur. Çoğalan hücreler, hücre döngüsüne girer ve mitozu uğrarlar. Programlanmış hücre ölümü nedeniyle oluşan hücreyel yok oluş ise, normal bir işlem olan DNA kısımlarının bir dokudan uzaklaştırılmasıdır ve bu, *apoptosis* olarak adlandırılan hücreyel ölüm şeklinde gerçekleşir [19].

Kanserin aile içerisinde seyredebileceği 200 yılı aşkın bir süredir bilinmektedir. Hastalar kansere neden olan genin sadece bir mutant allelini kalıtım yoluyla alırlar ve bu gen onları kansere yakalanmaya meyilli hale getirir. Sonunda da kişi büyük bir olasılıkla başlı başına mutant allele, diğer genlerdeki mutasyonlara ve çevresel faktörlere bağlı olarak kansere yakalanacaktır. Böylece, kanser riskini arttıran ve *kansere yatkınlık genleri* adı verilen bir sınıf geni tanımlayabiliriz [24].

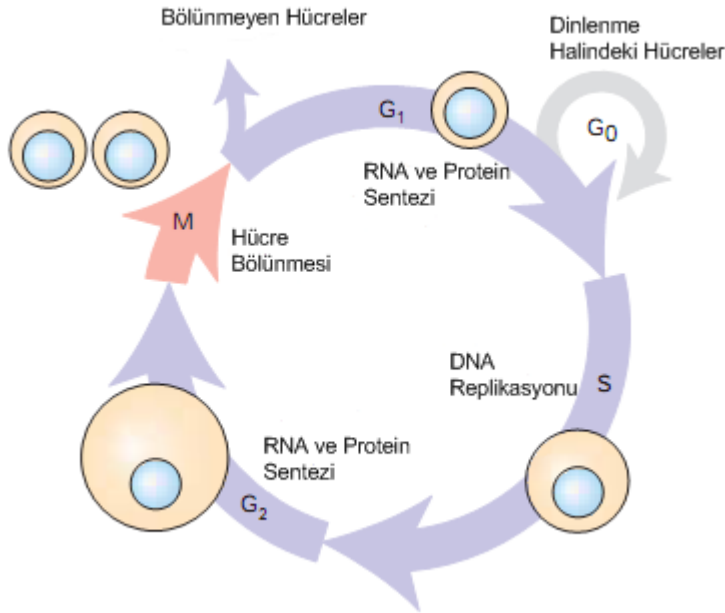
Kanserin başlaması ve gelişiminde rolü olan genler genelde “Kanser Genleri” olarak tanımlanır ve üç grupta toplanır: 1. *Proto-onkogenler*: Normalde hücre büyümesi ve bölünmesini başlatan ve sürdüren, hücre ölümünü (apoptozis) baskılayan proteinleri oluşturan genlerdir. Proto-onkogenlerin mutant aktif formları onkogenlerdir. 2. *Tümör baskılayan genler*: p53 gibi büyümeyi baskılayan ya da hücre ölümünü artırarak tümör büyümesini baskılayan genlerdir. 3. Mutasyonla inaktivasyonu sonucu bu iki grubun mutasyon hızını arttıran *Genom Kararlılık Genleri*. Bu üçüncü grup genle, DNA onarımını, kromatin bütünlüğünü koruyan ve düzenleyen genlerdir [25]. Mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi tüm kanserlerin ortak özelliği olarak kabul edilir [24,26].

### 1.1.2 Hücre Döngüsü ve Kanser

Hücre döngüsü çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Hücre döngüsü, hücre çoğalması, farklılaşma ve apoptozis gibi temel hücre fonksiyonları düzenlediğinden büyüme ve doku yenilenmeleri ile yakın ilişki içinde bulunmaktadır [27,28].

Hücre döngüsü interfaz ve mitoz olmak üzere iki bölümden meydana gelir. İnterfaz  $G_1$ -S- $G_2$  diye 3’e ayrılır. Bu süreçte hücre uyarımı ve büyüme meydana gelmekte veya bölünme sinyali almadıkları sürece dinlenme fazı  $G_0$ ’da durmaktadır [1,29,30,31].  $G_0$  birkaç gün, birkaç hafta sürebilir hatta hücre bölünmekten tamamen vazgeçebilir [32].  $G_1$ -S- $G_2$  16-24 saat sürer. Mitoz bölünme ise 1-2 saat sürmektedir. Hücre büyümesi  $G_1$  fazında kısıtlayıcı nokta (R noktası) tarafından koordine edilir. Kısıtlayıcı noktada hücre duracak veya hücre döngüsünü tamamlayacaktır [31,32,33]. Bu noktada hücre döngüsünün ilerlemesini sağlayan büyüme faktörü denem proteinler devreye girer ve bölünmeyi düzenler. Büyüme faktörü yokluğunda hücreler R noktasını geçemez ve dinlenme haliyle ( $G_0$ ) kalır (şekil 1.2) [32].

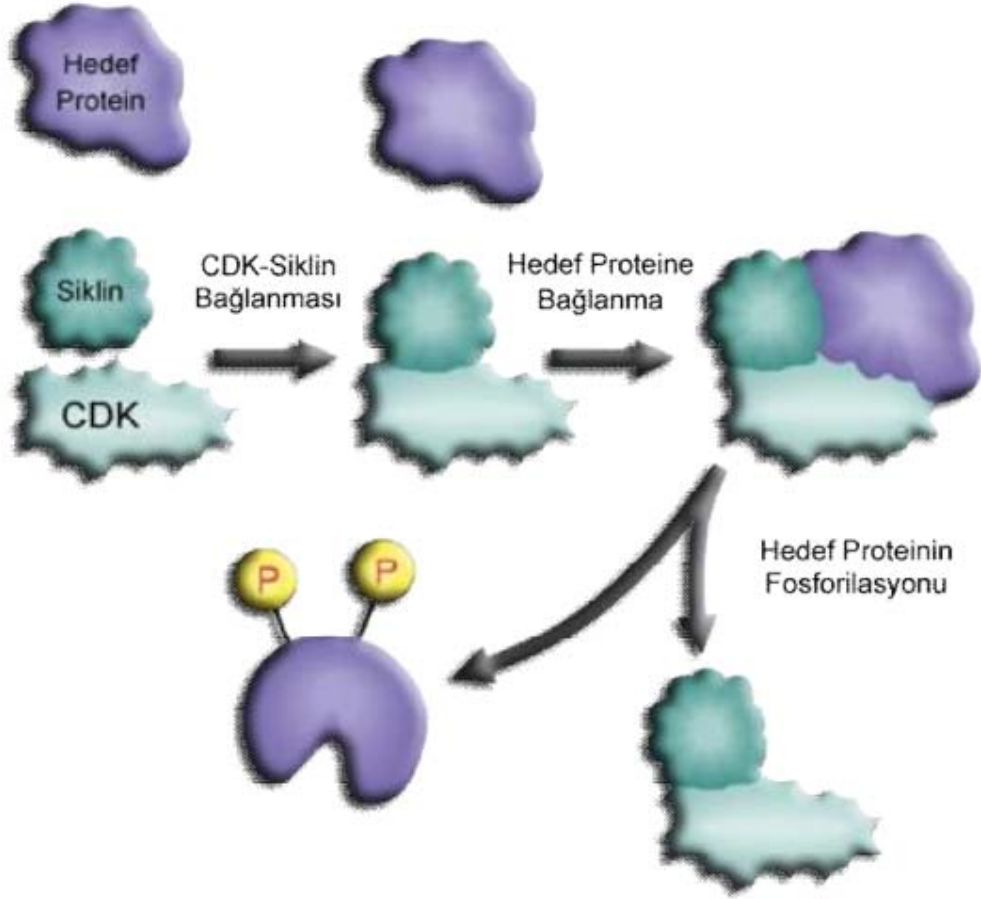
$G_1$  fazında hücreler kendi çevrelerini kontrol eder, sinyalleri alır ve büyümeyi artırır. Bu fazda DNA sentezi için hazırlık yapılır. RNA ve protein sentezi olur. S fazında ise DNA sentezlendikten sonra,  $G_2$  fazında hücre büyümeye devam eder, aynı zamanda RNA sentezi, protein sentezi gerçekleşir ve hücre mitoz hazırlanır [30,32,34]. Mitoz; profaz, metafaz, anafaz ve telofazdan oluşmaktadır. Telofazda sitoplazmik bölünme tamamlanır ve aynı genetik materyalli iki yeni hücre meydana gelir [31,33].



Şekil 1.2 Hücre Döngüsü [29].

Hücre döngüsü siklinler, siklin-bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz baskılayıcıları tarafından kontrol edilir [28,34]. CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler ancak siklinlerle etkileşime girerek aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana getirebilirler. Bu aktif kompleks hedef proteinleri fosforile ederek döngünün devamlılığını sağlar (şekil 1.3.). CDK-

siklin protein kompleksinde, CDK'lar katalitik alt üniteler iken siklinler düzenleyici alt üniteler şeklinde görev yapar [27,28,34]



Şekil 1.3 Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi ve Siklin Bağımlı Kinazlar [27].

Memeli hücrelerinde hücre döngüsünün düzenlenmesinde işlevleri en iyi bilinen 11 tane siklin bağımlı kinaz (CDK1-11) ve 16 siklin [siklin D(D1,D2 ve D3); siklin E (E1,E2), siklin A (A1,A2) ve B(B1,B2)] rol oynamaktadır [34,35].

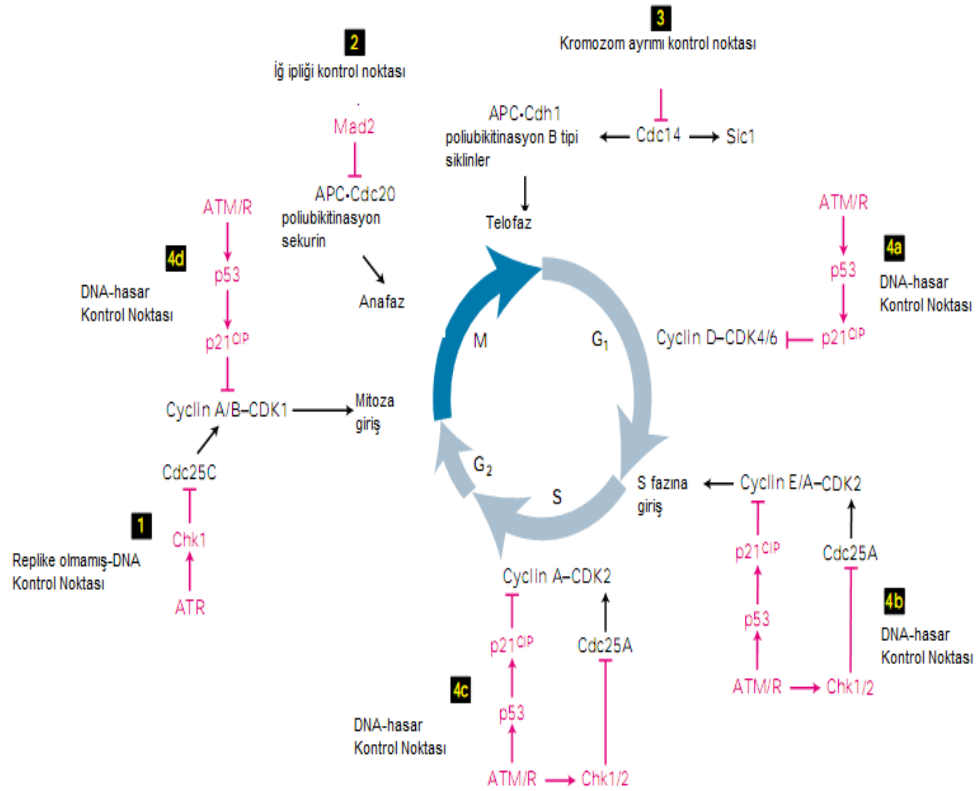
Hücre döngüsünün ilerlemesi esnasında CDK aktivitesi en az 4 moleküler mekanizmayla düzenlenir. Düzenlemenin ilk basamağı CDK'ların kendi siklinleri

ile eşleşmesidir. İkinci düzenleme CDK\SİKLİN kompleksinde CDK'nın 160. pozisyonu civarında fosforile edilmesidir. CDK'ların fosforilasyonla aktivasyonu "CAK" (CDK aktive edici kinaz) ile katalizlenir. Bu katalizörün esası yine bir CDK kompleksidir (CDK7\SİKLİN-H). Üçüncü düzenleme ise CDK proteinlerinin amino ucundaki threonin ve tirozin ile gerçekleşen engellemedir. Son düzenleme ise CDK\SİKLİN komplekslerine baskılayıcı proteinlerin bağlanması ile gerçekleştirilir [27,28].

Hücre bölünmesi sadece büyüme faktörleri tarafından değil keza hücre döngüsünü engelleyici faktörler tarafından da düzenlenir. Eğer bir DNA hasarı oluşursa, bu hasar tamir edilmedikçe hücre döngüsü kesilir. Yine bir takım hücre dışı faktör, hedef hücrelerin çoğalmasını uyarmaktansa engeller. Bu tür engelleyici uyarıcıların etkisi özellikle Cdk inhibitörleri tarafından arttırılır. Buna örnek; DNA hasarı sonucu P53 proteininin hücre içi seviyesi artar, bu proteinler de Cdk inhibitörü olan p21'in ekspresyonunu uyarmaktadır. P21 proteini bazı Cdk\siklin komplekslerini baskılayarak hücre döngüsünü durdurur [32].

Hücre döngüsünde bir faz tamamlanmadan sonraki faza geçilirse genetik materyal tam ve doğru kopyalanmadığı için hücrede hasar meydana gelebilir. Hücre döngüsünde G<sub>1</sub>-S geçişinde, G<sub>2</sub>-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları vardır. Bu kontrol noktalarında hücrenin döngüye devam edip etmeyeceği kararı verilir [1,36]. Birincisi G<sub>1</sub>\S Kontrol noktası olup, bir önceki mitozu izleyen dönemde hücrenin eriştiği boyutu ve DNA'nın hasar görüp görmediğini kontrol eder [24]. Bu düzenleme noktası ilk kez *Saccharomyces cerevisiae* de belirlenmiş ve START (Başlangıç) olarak adlandırılmıştır. Bütün hücreler START noktasını geçerek S evresine girer [32]. Eğer hücre uygun bir boyuta ulaşmadıysa ya da DNA'sı hasar gördüyse, bu koşullar düzeltilene kadar döngünün ilerleyişi durdurulur. Eğer başlangıçta her iki durum normal ise kontrol noktası aşılır ve hücre döngünün S evresi boyunca ilerler. İkinci önemli kontrol noktası ise G<sub>2</sub>\M kontrol noktası olup burada, mitoz girilmeden önce hücrenin fizyolojik koşulları gözden geçirilir. Eğer DNA replikasyonu ya da herhangi bir DNA hasarının onarımı

tamamlanmamışsa, bu olaylar tamamlanana kadar hücre döngüsü durdurulur. Son kontrol noktası ise mitoz içinde yer alır ve M kontrol noktası olarak adlandırılır. Burada hem iğ iplikleri sisteminin başarılı bir şekilde oluşup oluşmadığı hem de sentromerlerle bir araya gelmiş kinetokorlara tutunup tutunmadığı kontrol edilir [1,24,32].



Şekil 1.4 Hücre Döngüsü ve Kontrol Noktaları [29].

Hücre döngüsü kontrolünün ve kontrol noktalarının önemi bu düzenleme sistemi bozulduğunda nelerin olabileceği farz edilerek gösterilebilir. Örneğin; eğer hücrenin DNA'sı hasar gördüyse ve bu şekilde hücre döngüsü boyunca ilerlemesine izin verildiyse, kanserleşmiş bir hücreyi tanımlayan kontrolsüz hücre bölünmeleri dizisi başlayabilir [24].

Hücre döngüsünde iki tip gen grubunun rolü vardır: Onkogenler (Her 2, Ineu, ras, myc vb.) ve Tümör Baskılayıcı Genler: p53 ve Rb (retinoblastoma geni) [35].

### 1.1.3 Onkogenler

Normal fonksiyonu hücre bölünmesini teşvik olan genler proto-onkogenler olarak adlandırılır. Hücre bölünmesinin düzenlenmesi için bu genler ve/veya bu gen ürünleri inaktifleştirilmiş olmalıdır. Eğer proto-onkogenler sürekli çalışır hale gelirse kontrolsüz hücre bölünmesine neden olur, bu da tümör oluşumuna öncülük eder. Proto-onkogen mutasyonlarının bir sonucu olarak böyle bir durum oluştuğunda, bu genlere onkogen adı verilir, çünkü bu genler kanserle ilişkili olarak kontrolsüz hücre çoğalmasını uyarırlar [24]. Onkogenler dominant fenotipik etkiye sahiptir. Kansere katkı için iki allel genden birisinin mutasyonu yeterlidir. Proto-onkogenler evrimsel süreçte çok iyi korunmuş genlerdir [25]. Aşırı aktivitelerinden dolayı, onkogenler genetik olarak proto-onkogenlere baskındır, yani onkogenin sadece bir kopyası hücrenin davranışında bir değişime neden olmak için yeterlidir [37].

Onkogenler, hücre çoğalmasını yöneten proto-onkogenlerin fizyolojik gereksinimlerin ötesinde çoğalma uyarıları doğuracak şekilde mutasyona uğramaları ile aktive olurlar. Bir başka deyişle, hücre bu genetik değişimle daha önce sahip olmadığı bir fonksiyon kazanmış olur [38].

Proto-onkogenlerin ürünleri beş grup altında toplanabilir:

- i. Büyüme faktörleri (örneğin EGF, PDGF, IGF gibi birinci haberciler)
- ii. Büyüme faktörü reseptörleri (örneğin EGFR=c-ERB B)
- iii. Sinyal ileticiler ( tirozin kinaz SRC, sinyal iletici ya da ikinci haberci RAS ve RAF

- iv. Nükleer genler ve transkripsiyon faktörleri
- v. Hücre döngüsünün kontrolünde görevli genler [25, 40].

Çizelge 1.4 Bazı Onkogenler [22,25].

Gen	Bölgesi	Mutasyon Tipi	Başlıca Tümör Örnekleri
ABL	(9q34.1)	Translokasyon	KML
AKT2	(19q13)	Gen Çoğalması	Meme ve ovaryum
ALK	(2p23)	Translokasyon	Lenfoma
BAX	(19q13.3-4)	Nokta	Kolon ve mide
BCL2	(18q21.3)	Translokasyon	Lenfoma
BCL6	(3q27)	Translokasyon	Lenfoma
BRAF	(7q34)	Nokta	Melanom, kolorektal, tiroit
CCND1	(11q13)	Translokasyon	Lösemi, meme
EGFR	(7p12.3)	Nokta, çoğalma	Glioblastom
EPHB2	(1p36.1)	Nokta	Prostat
ERBB2	(17q21.1)	Gen çoğalması	Meme ve over
EVII	(3q26)	Translokasyon	Lösemi
EWSR1	(22q12)	Translokasyon	Lenfoma ve lösemi
FBXW7	(4. kromozom)	Nokta	Kolon, uterus, meme, over
FES	(15q26.1)	Nokta	Kolon
FGF3	(11q13)	Çoğalma	Mide, meme, melanom
FGFR1	(8p11.2)	Trans., nokta	Lenfoma, mide
FLT3	(13q12)	Nokta	Lösemi, anjiosarkom
FOXO1A	(13q14.1)	Translokasyon	Rabdomyosarkom, lösemi
GLI	(12q13.2)	Gen çoğalması	Beyin, sarkomlar
HMGA2	(12q14.3)	Translokasyon	Lipomlar
HOXA9,11,13	(7p15-p14.2)	Translokasyon	Lösemiler
K-RAS2	(12p12.1)	Nokta	Kolorektal, pankreatik
MAP2K4	(17p11.2)	Nokta	Pankreas, meme, kolon
MLL	(11q23)	Trans., nokta	Lösemiler
MYC	(8q24.12)	Gen çoğalması	Lenfoma, nöroblastom
NOTCH1	(9q34.3)	Translokasyon	Lösemiler
NTRK1	(1q21-q22)	Trans., nokta	Tiroid, meme, kolon
NTRK2	(9q22.1)	Nokta	Kolorektal
NTRK3	(15q25)	Trans., nokta	Kolon
PDGFB	(22q12.3)	Translokasyon	Dermafibrosarkomlar
PDGFRB	(5q31)	Translokasyon	Lösemiler
PIK3CA	(3q26.3)	Nokta	Kolon, mide, beyin, meme
PTNP1	(12q24)	Nokta, delesyon	Lösemi, kolon
RARA	(17q21.1)	Translokasyon	Promyelositik lösemi
SMAD2	(18q21)	Nokta	Kolon, meme
SS18	(18q11.2)	Translokasyon	Snovyal sarkomlar
TAL1	(1p32)	Translokasyon	Lösemiler
TFE3	(xp11.22)	Translokasyon	Böbrek, sarkomlar
TGFBR1	(9q33-q34)	Nokta	Kolon, mide, over

#### 1.1.4 Tumor Baskılayıcı Genler

Tumor baskılayıcı genler mutasyona uğrayarak aktivitelerini kaybettiklerinde hücrelerin kanserleşmesine neden olur. Normal hücrelerdeki bir tumor baskılayıcı gen hücre bölünme oranını kontrol etme işlevi görür [39].

Tumor baskılayıcı genler, hücre döngüsü bölümlerinin birbirine geçişini baskılar ya da inaktive eder ve hücre bölünmesini durdurur. Bu genler ya da onların ürünleri, hücre bölünmesi için ya inaktif olmalıdırlar ya da hücrede bulunmamalıdırlar. Eğer bu genler kalıcı olarak inaktive edilirse ya da mutasyonlarla ortadan kaldırılırlarsa, hücre bölünmesinin kontrolü kaybolur ve hücre kontrolsüz bir biçimde bölünüp çoğalmaya başlar [23,24]

Kanser gelişimi için tumor baskılayıcı genlerin allellerinin her ikisinin de mutlaka mutasyona uğraması gerekir [23,24].

Onkogenler ve tumor baskılayıcı genlerin birbirine zıt etkileri vardır. Onkogen, proto-onkogenin fonksiyon kazandıran mutasyonu sonucu oluşup, tumor oluşumuna sebep olurken, tumor baskılayıcı gende meydana gelen bir mutasyon hücre büyümesini sınırlama yeteneğinde bir fonksiyon kaybına neden olur [39].

Tumor baskılayıcı genlerin en kapsamlı araştırılmış olanı p53 genidir. p53 geni ilk defa 1979 yılında Lane ve Crawford, bunların hemen arkasından da Linzer ve Levine tarafından nükleer fosfoprotein olarak tanımlanmıştır [40]. David Lane ise immunohistokimyasal yöntemlerle insan tümörlerinde p53 genini göstermiştir [40]. p53 geni 17. kromozomun kısa kolu üzerinde 17p13-1 pozisyonunda bulunan bir tumor baskılayıcı gendir. 16.20 kb uzunluğunda olan bu gen 11 ekzondan

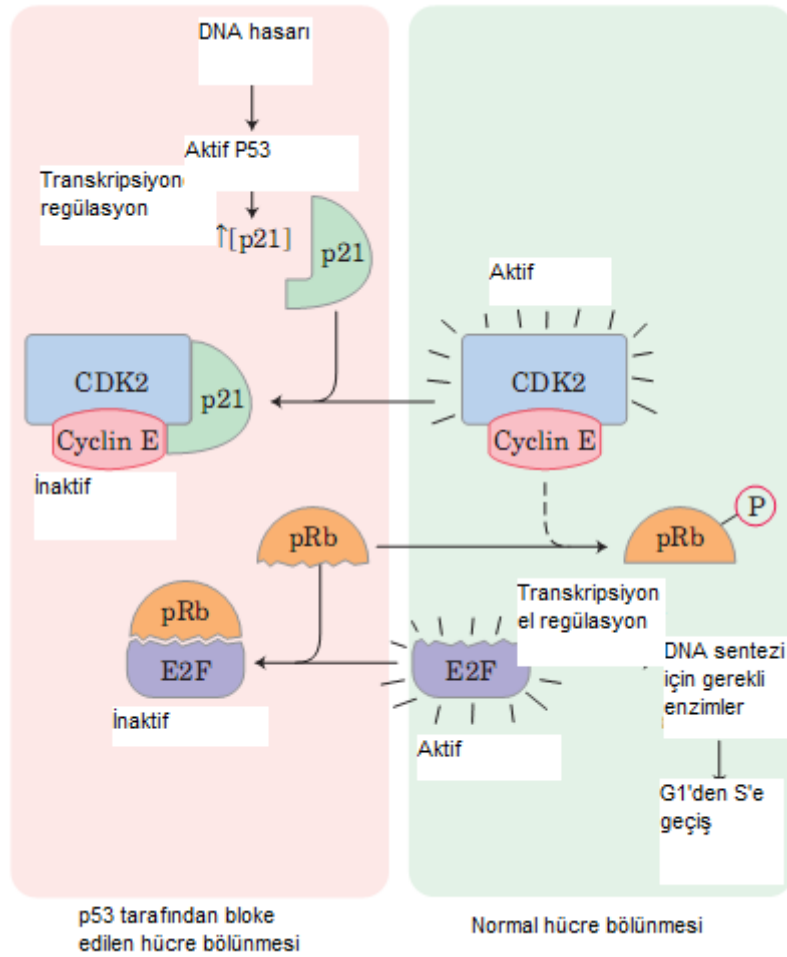
oluşmaktadır. 2 ve 11 ekzonda bulunan DNA kısmı 8-10 kb uzunluğunda olup kodlama yapamaz [40].

Normal koşullarda pek az ifade edilen p53 geni DNA üzerinde bir hasar oluştuğu zaman hücre bölünmesini o aşamada durdurur ve hasarın niteliğini değerlendirir. Eğer DNA hasarı onarılabilecek nitelikte ise DNA onarım enzimleri göreve çağrılır, hasarlı kısım kesilip çıkartılır ve doğru sıralamaya göre yeniden sentez edilir. Eğer hasar daha büyük boyutlu ise hücre bölünmesi iptal edilir [38]. Böylece p53 programlanmış hücre ölümü olan apoptozisi uyaran gen olarak tanımlanmıştır [41,42,43].

p53 gen mutasyonları insan kanserlerinde en sık rastlanan mutasyonlar arasındadır. p53 mutasyonları tümör gelişimine neden olduğu gibi tedavi direncini de belirler [38].

Yine iyi aydınlatılmış olan diğer bir tümör baskılayıcı gen örneği, retinoblastoma genidir. Rb hücre döngüsünü etkileyen nükleer bir fosfoproteindir. Dinlenme halindeki ( $G_0$ ) hücrelerde fosforile olmamaktadır [39]. Rb hücre döngüsünün farklı dönemlerinde hipofosforile edilip daha sonra hiperfosforile edilir. Hipofosforile olduğunda  $G_1$  ile S arasında hücre döngüsünü bloke eder. DNA sentezini ilerleten transkripsiyon faktörlerine bağlanıp onları inaktive ederek, hücrenin S fazına girmesini engellemiş olur. Rb daha çok fosforile oldukça protein bağlayıcı partnerlerini serbest bırakır ve hücrenin S fazına girmesine izin verir; daha sonra progressif bir şekilde defosforile olarak yeniden bir sonraki hücre döngüsünün S fazına girmesini engelleyerek fonksiyonunu tekrarlar. Rb gen kaybı, hücrelerin önemli bir mitotik kontrol noktasını kaybetmesine ve kontrolsüz çoğalmasına yol açar (Şekil 1.5) [19,42].

Retinoblastoma, retina da tümörü kapsayan bir çocukluk hastalığıdır. Kalıtsal veya sporadik olarak oluşabilir. Sıklıkla 13. Kromozomun q14 bandının delesyonu ile ilişkilendirilmiştir. Rb allellerinin her ikisi de inaktive olduğunda retinoblastoma boy gösterir. Retinoblastoma, çoğunlukla gen ekspresyonunu engelleyen mutasyonlar sebebi ile protein fonksiyonunda kayıp sonucu meydana gelir. Rb kaybı osteokarsinoma ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi birçok kanser tipi ile de ilişkilendirilmiştir [39,42].



Şekil 1.5 Retinoblastoma Proteini ile G1'den S'e Geçişin Düzenlenmesi [42].

## **1.2 Gastrointestinal Sistem Kanseri**

Gastrointestinal sistem kanserleri kanser ölümlerinin ilk üç sırası içerisinde, erkeklerde akciğer, kadınlarda akciğer ve meme kanserlerinden sonra yer almaktadır [4].

### **1.2.1 Mide Kanseri**

#### **1.2.1.1 Epidemiyoloji**

Ülkemizde ve dünyanın birçok yerinde, sindirim sisteminin en sık rastlanan kanser türü mide kanseridir. Sıklığı giderek azalmakla birlikte dünyada akciğer kanserinden sonra ikinci sırada sık rastlanan kanserdir. Dünyada her yıl 670.000 kişide yeni mide kanseri tanısı konur ve her yıl 750.000 kişi bu hastalıktan yaşamını yitirmektedir. Tüm kanserlerin %9,9'unu oluşturur. Değişik bölgelerde görülme sıklığı önemli farklar göstermekle birlikte erkeklerde daha sıktır [5,6].

Mide kanserlerinin ülkemizdeki durumuna bakılırsa; 1990 yılında yapılan bir araştırmaya göre mide kanserleri erkek kanserlerinin %7,5'ünü, kadın kanserlerinin ise %6,7'sini oluşturmaktadır [44,45].

Mide kanseri olgularının daha sık görüldüğü ülkelerde genel gözetimler sayesinde nadir görülen ülkelere oranla kanser sonrası beş yıllık hayatta kalma oranı daha yüksektir. Dünyada mide kanserinin en sık görüldüğü ülke Japonya'dır. Görülme sıklığı 100.000'de 69'dur ve 40 yaş üzeri bireylerde yıllık endoskopi zorunluluğu vardır. Amerika'da ise bu oran 100,000'de 2 olarak hesaplanmıştır. Buna rağmen Japonya'da beş yıllık hayatta kalma oranı erken teşhis sayesinde %40-50 iken Amerika'da bu oran %20'dir [46].

Santral ve Güney Avrupa’da, eski Sovyetler Birliği’nde, Şili, Çin ve Kosta Rika’da en sık görülen kanserdir. Uganda, Hindistan, Güneydoğu Asya ve Amerika Birleşik Devletlerinde ise nispeten nadirdir. Türkiye’de ise hali hazırda en sık görülen gastrointestinal kanser tipidir [5].

#### **1.2.1.2 Risk faktörleri.**

Karbonhidrat ve tuzdan zengin diyet, küflenmiş tahılların tüketimi, taze meyve ve sebzedden fakir diyet, konserve ve turşu gibi gıdalardan zengin beslenme önemli risk faktörleridir. Sigara özellikle kardial bölgede kanser riskini artırıyor olabilir. Alkol ise daha zayıf bir risk faktörüdür [6].

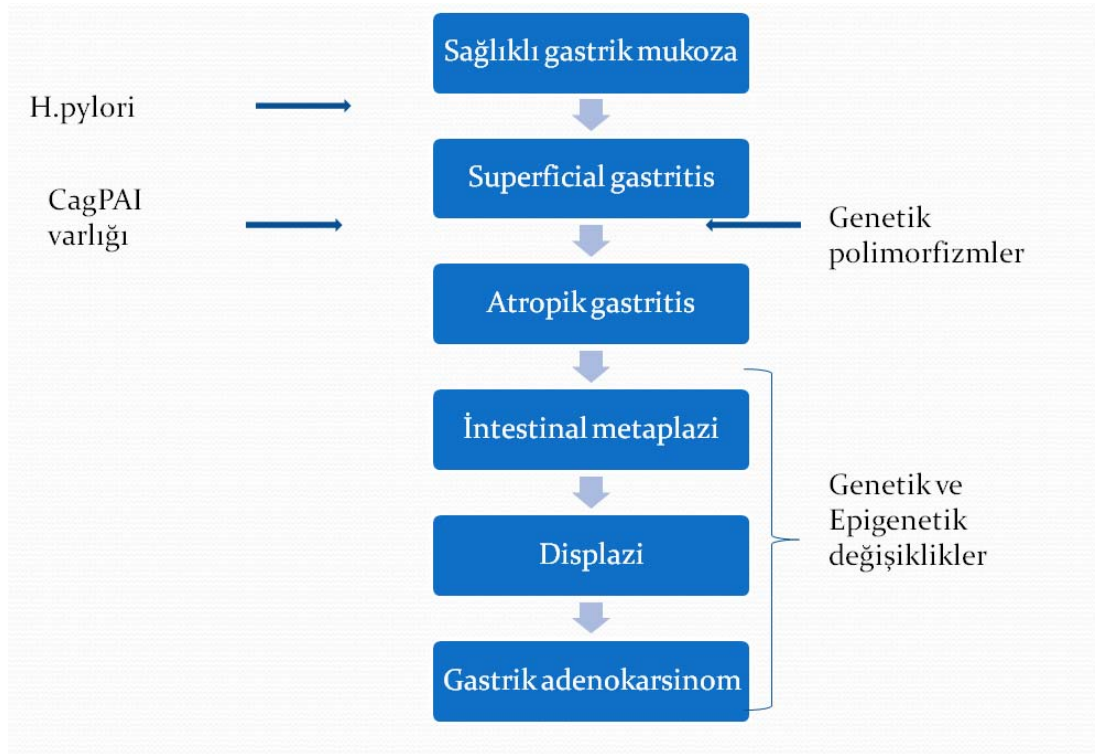
Distal mide kanserlerinin %35-89’u doğrudan *H. pylori* enfeksiyonu ile ilişkilidir (Şekil 1.6). *H.pylori* enfeksiyonu intestinal tip mide kanseri riskini 3; diffüz tip mide kanseri riskini ise 8 misli artırır. Risk artışı kadınlarda ve siyahilerde daha belirgindir [5]. 1994’de Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) tarafından *H.pilori* 1. derecede kanserojen olarak sınıflandırılmış ve kanser gelişiminde de önemli rolü olduğu bulunmuştur [47].

1990 yılında Burke ve arkadaşları Epstein Barr Virüs ile mide kanseri arasında ilişkiyi tanımlamışlardır. EBV bağımlı kanser tipinin daha çok erkek hastalarda gözlemlendiği ve midenin kardial bölgesine yerleşmiş olduğu bulunmuştur [47].

1953’te Aird, A kan grubu ile mide kanseri arasındaki ilişkiyi tanımlamıştır. A grubunda, 0 grubu hastalara göre bağıl risk 1-2 kat daha fazladır [44].

### 1.2.1.3 Patoloji

Mikroskopik görünüm açısından sınıflandırılmaları güçtür çünkü bir tümör kitlesinde değişik histolojik özellikler bir arada bulunabilir. Morfolojik özelliklerine göre gastrik kanserler WHO sınıflandırmasına göre 5 tipe ayrılır, bunlar; adenokarsinom, adenosquamöz karsinom, squamöz hücreli karsinom, farklılaşmamış karsinom ve sınıflandırılmayan karsinomlardır. Adenokarsinomlar farklılaşma derecelerine papiller, tübüler, müsünöz ve taşlı yüzük hücreli tümörler olarak 4 ayrı tipe ayrılır. Aynı tümör içinde değişik derecelerde farklılaşma gösteren karışık bir yapı saptanır ve hakim olan yapıya göre sınıflandırma yapılır [44].



Şekil 1.6 Gastrik Karsinogenez [46].

Mide kanserlerinin %95'den fazlası adenokarsinomlardır. Nadir olarak squamous, adenosquamous ve farklılaşmamış kanserler görülür ve bunlar sıklıkla gastro-özofagus bağlantısında bulunurlar [47].

Mide adenokanseri mikroskopik olarak intestinal ve difüz tip olarak ikiye ayrılır (Lauren sınıflaması). İntestinal tip, intestinal metaplazi zemininde gelişir ve polipoid kitleler oluşturur; prognoz (bir hastalığın süresi ve gelişimi hakkında tahmin) daha iyidir. Difüz tipte ise salgı doku oluşumu yoktur, sitolojik olarak az farklılaşmıştır, taşlı yüzük hücreler içerebilir, fazla miktarda ekstraselüler mükün salgılayabilir. Seyrek olarak adenokarsinom skuamöz komponentler veya koryokarsinoma odakları içerebilir. Bu tip kansinomlar sıklıkla daha agresif seyirlidir. Daha nadir olarak görülen paryetal hücreli tümörler ise, adenokarsinoma göre daha iyi prognoza sahiptir. İntestinal tip, selüler yapısıyla tanımlanırken, difüz tip büyüme paterni ile tanımlanır, buna göre polipoid ve süperfisyal kansinomlar intestinal tipe, linitis plastika ise difüz tipe girer. Ülseratif tümörler ise her iki tipe de girebilir [5,44].

Lenfoma, mide kanserleri arasında ikinci sıradadır. Tanı konulduğunda tümör boyutu genellikle çok büyüktür. Lezyonun büyüklüğü ile belirtileri arasında genellikle çok az ilişki vardır [48].

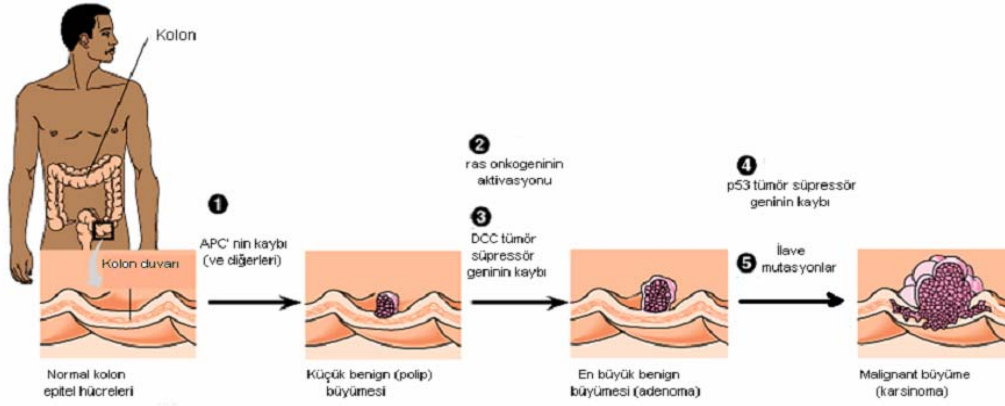
## **1.2.2 Kolon Kanseri**

### **1.2.2.1 Epidemiyoloji:**

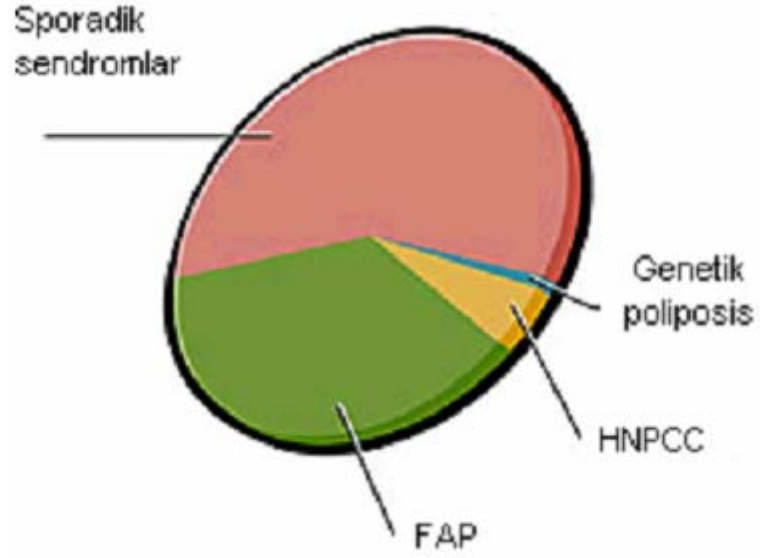
Kolorektal kanserler, erkeklerde akciğer ve prostat, kadınlarda ise akciğer ve meme kanserinden sonra en sık görülen kanserlerdir [49]. Dünya çapında her yıl 940.000 kolorektal kanser vakası gözlenmektedir [18]. Meme ve prostat kanserinde de olduğu gibi gelişmiş ülkeler, zengin Asya ülkeleri ve Güney Avrupa'da görülme

sıklığı daha azdır [50,22]. Kolorektal kanser görülme sıklığı 40 yaşından itibaren artar [51]. Pek çok kanserde olduğu gibi, kolon kanserinde çok basamaklı bir mekanizmayla kanser oluşumu başlar (Şekil 1.7).

Kolorektal kanserlerin %75'ini hiçbir risk faktörü bulunmayan sporadik kanser olguları oluşturur [52]. Bazı ailesel kanser sendromları kolon kanseri riskini spesifik olarak artırır, bunlar; Ailevi Adenomatous Polipozis Koli (FAP), Kalıtsal Non-Polipozis Kolon Kanseri (HNPCC), Peutz-Jeghers Sendromu (PJS), ve Cowden Hastalığı'dır (Şekil 1.8) [22].



Şekil 1.7 Kolon Karsinogenezi [53].



Şekil 1.8 Kolon Hastalıkları Oranları [53].

**Ailesel Polipozis Koli;** kolon kanserlerinin küçük bir kısmını oluşturur. İnsidansı yaklaşık 10000’de 1’dir. FAP heterozigotlarda yaşamlarının ilk 20 yılında çok sayıda benign adenomatöz polipler oluşur ve poliplerden en az biri malignleşir. Kolonun cerrahi olarak çıkarılması (kolektomi) malign gelişimi önler. Hastalık otozomal dominant olarak kalıtılır ve sorumlu olan gen 5. Kromozomun uzun koluna (5q) da haritalanan ve heterozigozite kaybından (LOH) sorumlu APC genidir (Şekil 1.7) [19,53,54,55].

**Kalıtsal Non-Polipozis Kolon Kanseri, Lynch Sendromu (HNPCC);** Kolon kanserlerinin yaklaşık %2-4’ünü oluşturur. Tarihi açıdan, patolog Aldred Warthin tarafından bir ailede yapılan ilk tanımlamadır. 1895 yılında çalışılmaya başlanmış ve 1913’de yayınlanmıştır. Bu aile G aile olarak bilinmektedir. 1972 yılında Lynch ve Krush tarafından yeniden çalışılmıştır ve HNPCC özelliklerine sahip olduğu ortaya konmuştur. Otozomal dominant bir geçiş özelliği gösterir. Erişkin yaşlarda izlenen bir kolon kanseri olmasına rağmen, FAP’a nazaran daha genç yaşta görülen ve adenomatöz poliplerin olmadığı bir hastalıktır. Diğer tümör

baskılayıcı genlerde olduğu gibi HNPCC'nin otozomal dominant kalıtım şekli, somatik hücredeki bir mutant allelin aktarımı ve diğer normal alleldeki bir mutasyonda ya da inaktivasyonu sonucu ortaya çıkar [19,53,55].

Kolorektal kanser gelişiminin ileri basamakları KRAS aktivasyonu, P53 fonksiyon kaybı, TGF $\beta$ 'ya hücrel sorumluluk inaktivasyonu gibi mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir [22].

### **1.2.2.2 Risk faktörleri**

Kolorektal karsinoma yaygınlığında genetik zeminin rolü olduğu gibi çevresel faktörlerin de etkisi vardır. İleri derecede risk faktörleri; ileri yaş, Familial polipozis/Gardner sendromu, Herediter nonpolipozis kolorektal kanser, uzun süreli ülseratif kolitken, orta derecede risk faktörleri ise yüksek kırmızı et içeren diyetle beslenme tarzı, daha önce adenom hikayesi olması, pelvik radyoterapi uygulanmış olmasıdır. Zayıf risk faktörleri ise; yüksek yağ içeren diyetle beslenme tarzı, alkol ve sigara içilmesi, obezite, uzun boy, kolesistektomi ameliyatı, yüksek şükroz tüketimi olarak gösterilmiştir. Koruyuculuk değeri az olan faktörler ise yüksek sebze /meyve içeren diyet, yüksek folat/metionin alımı, yüksek kalsiyum alımı, post menopozal hormon yerine koyma tedavisi iken aspirinin ise koruyuculuk değeri orta derecededir [50,56].

### **1.2.2.3 Patolojisi**

Kolon kanseri, kolonun yukarı, orta ve aşağı üçte birinde eşit olarak bulunur. Lezyon malign bir polip olabilir. Kanserlerin çoğu polipoid ya da ülseratif tümörler olup az bir kısmı da plak tarzında lezyonlardır. Genel bir kural olarak tümör ne kadar yassı bir plak halinde ise malignite derecesi o kadar yüksektir [57]. Kolorektal kanserlerin %95 gibi büyük bir kısmını adenokarsinomalar oluşturur [56].

Adenokanserlerin yaklaşık %20'si iyi farklılaşmış, %60'ı orta farklılaşmış ve kalan %20'si kötü derecede farklılaşmıştır [57].

### **1.2.3 Karaciğer Kanseri**

Karaciğerin habis tümörleri primer tümörleri ve metastatik (sekonder) tümörleri kapsar. Her tümörün kendine özgü özellikleri olmasına rağmen, klinik belirtileri benzerdir. Metastatik tümörlerin tanısı hastaların takiplerine bağlı olarak daha fazla yapılmaktadır [58].

Karaciğerin malign tümörleri şunlardır: hepatosellüler karsinom, intrahepatik kolanjiyosellüler karsinom, hepatokolanjiokarsinom, hepatoblastom, anjiyosarkom, epitelooid hemanjiyopitelioma ve diğer sarkomlar (leimyosarkom, rabdomiyosarkom, indifferansiye embriyonel sarkom). Karaciğer kanserlerinin tümüne yakını hepatosellüler karsinom (HCC) ve intrahepatik kolanjiyosellüler karsinom (CCC) oluşturur [59].

#### **1.2.3.1 Epidemiyoloji:**

Tüm dünyada HCC sıklığı yüksek olan bir tümördür. Asya ve Güney Afrika'da sıklık 100/100.000'dür. Avrupa ve ABD'de 100.000'de yıllık yeni hasta sayısı erkeklerde 3-4, kadınlarda 1-2'dir. HCC'nin yeryüzündeki dağılımı hepatit B yüzey antijeni taşıyıcılığının dağılımıyla belirgin biçimde paralellik göstermektedir. Çoğunlukla görülme yaşı batı ülkelerinde 50-60 yaşlar arasındadır, Asya ve Afrika'da ise daha genç yaşlarda olmaktadır. Sıklığı giderek artmakla birlikte, her yıl dünyada yaklaşık 250.000-1.250.000 kişi HCC'den ölmektedir. Tek başına Çin'de yıllık bu hastalıktan ölen insan sayısı 100.000'dir. Afrika'da ortalama görülme yaşı 25-35'dir. Ülkemizde sık rastlanan tümörler arasında görülür. Hepatosellüler karsinomlu hastaların yaklaşık %80'inde siroz vardır. Erkeklerde 4-8

kat sık görülür. Kansere bağlı mortalite istatistiklerinde, erkekte 8'inci, kadın da 12'inci sırada ölüme yol açan önemli tümörlerdir. Belirtileri karnın sağ tarafında ağrı, halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybıdır [5,58,60].

Karaciğerin metastatik tümörleri primer karaciğer tümörlerinden 20 kat daha sık görülmektedir (Çizelge 1.5) [61].

Çizelge 1.5 Karaciğer Metastazı Görülen Primer Tümör Sıklıkları [61].

<b>Primer tümör lokalizasyonu</b>	<b>Sıklık (%)</b>
<b>Pankreas</b>	70
<b>Kolon</b>	55
<b>Meme</b>	53
<b>Melanom</b>	50
<b>Mide</b>	44
<b>Akciğer</b>	42
<b>Özofagus</b>	30
<b>Böbrek</b>	24
<b>Prostat</b>	13

### **1.2.3.2 Risk faktörleri**

Hepatit B virüsü (HBV) taşıyıcılarında, C tipi hepatitte (HCV), Alkolik sirozlarda, gıdalarla aflatoksin alınan bölgelerde, hemokromatoz, arsenik, vinil klorür gibi maddelerle temas edenlerde kanser riski hızla artmaktadır [58, 60].

### **1.2.3.3 Patoloji**

Makroskopik görünümüne göre HCC üç şekilde görülür: 1. Massif tip; 2. Nodüler tip; 3. Diffüz tip. Nakashima tarafından yapılan sınıflandırmada ise dört tip vardır: infiltratif, ekspansif, mikst infiltratif-ekspansif ve diffüz. Mikroskopik olarak genellikle habis hücreler arasında çok az stroma vardır ve tümör yumuşak kıvamdadır. Tümör yüksek oranda vasküler yapıdadır [58].

### **1.2.4 Pankreas Kanseri**

#### **1.2.4.1 Epidemiyoloji**

Pankreas kanseri gastrointestinal sistemin habis hastalıkları içerisinde en hızlı ilerleyen ve prognozu kötü olan bir hastalıktır. Tüm kanserler arasında görülme sıklığı 4. sıradadır. Beş yıllık yaşam süresi %2-3'tür. Erkeklerde daha sık görülür. Pankreas kanseri yaş ile belirgin bir biçimde artar. Pankreas kanserlerinin yaklaşık olarak %80'i 60-80 yaş arasında görülür. Yine yapılan başka bir çalışmada pankreas kanserinin erkeklerde daha çok pankreas başında, kadınlarda ise daha çok pankreas gövde ve kuyruğunda yerleşme eğiliminde olduğu öne sürülmüştür [5,50,62].

#### **1.2.4.2 Risk faktörleri**

Yüksek alkol, sigara ve yağlı yiyecek tüketiminin pankreas kanseri riskini arttırdığı ortaya konulmuştur. Bununla birlikte Farrow ve Davis tarafından yapılan çalışmada diğer çalışmalarla da uyumlu olarak aşırı et tüketimine bağlı olarak protein alınımı 2,5 kez artmış pankreas riskini ortaya koymuştur. Diğer çalışmalarla da birlikte fazla kahve tüketiminin yanında radyasyon, endüstriyel etkilenmeler de pankreas kanseri riskini arttırmaktadır [62,63].

Pankreas kanseri riskinin diabetis mellitus ile iki kat, herediter pankreatitte ise beş kat arttığı bildirilmiştir [5].

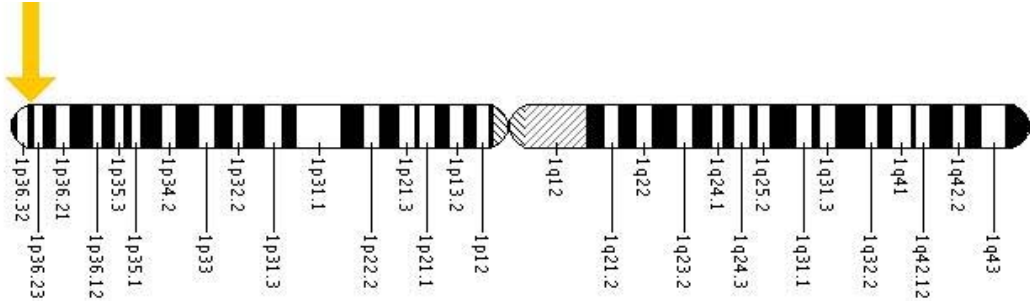
#### **1.2.4.3 Patolojisi:**

Pankreas kanserlerinin %70-80'i kanalla ilgili karsinomlardır ve yaklaşık olarak 2\3'ü baş kısmında, 1\3'ü gövde ve kuyruklara yerleşir. Çok hızlı büyüyen tümörlerdir ve tanı koyulduğunda büyük çoğunluğu pankreas dışına yayılmıştır. [62,63].

### **1.3 Gastrointestinal Sistem Kanselerinde Gözlenen Onkogenler**

#### **1.3.1 MTHFR (Metilen Tetra Hidrofolat Redüktaz)**

MTHFR geni 5,10-Metilentetrahidrofolat redüktaz proteinini şifreler [10]. Gayette ve arkadaşları (1994) floresans in situ hibridizasyon yöntemiyle MTHFR geninin 1p36.3 de olduğu belirlenmiştir (Şekil 1.9) [8]. Gen 150 kDa'luk, 656 amino asitten oluşan homodimerik bir proteini şifreler. İnsanda MTHFR geni 11 ekzondan oluşur [8,9]



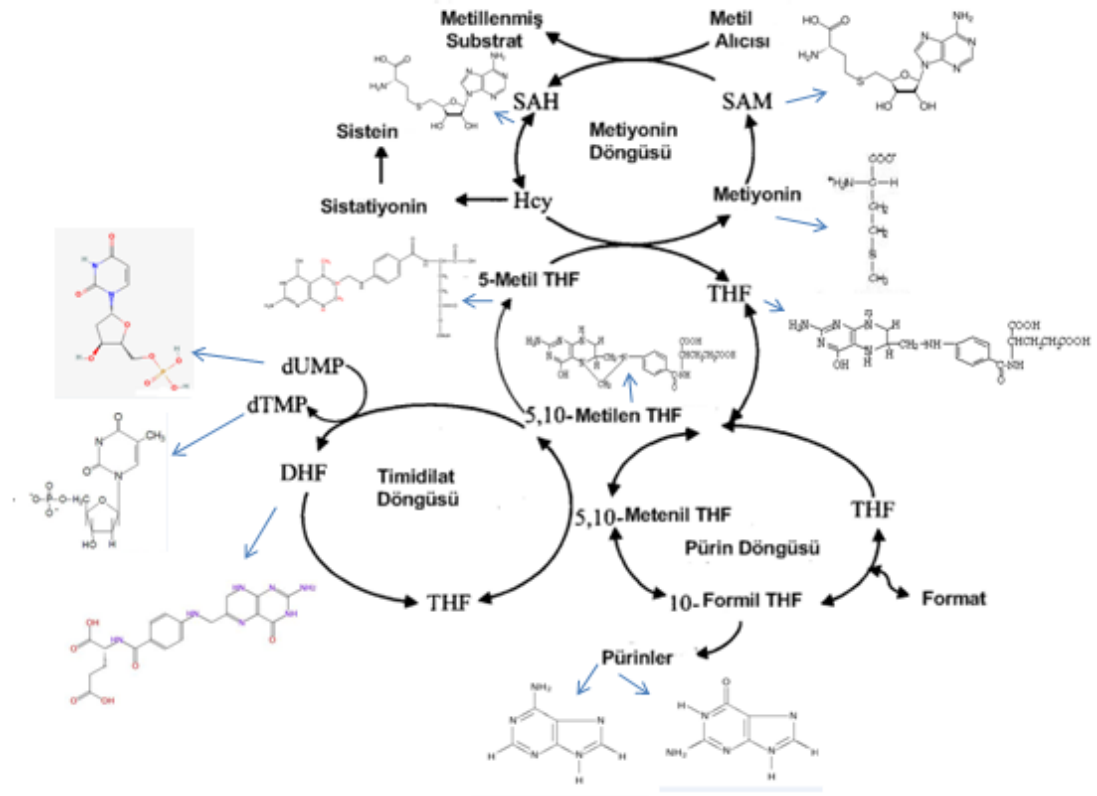
Şekil 1.9 MTHFR (Metilentetrahidrofolat redüktaz) Geninin Lokalizasyonu [64].

MTHFR geni 77kDa'dan oluşan birbirine eş iki altbirimi olan enzimi kodlar. Bu alt birimlerin her biri 40 kDa N-terminal domain ve 37 kDa C-terminal domain içerir. [65]

MTHFR folat metabolizmasında anahtar enzim rolündedir. Enzim folat koenzimlerinin pürin, pirimidin sentezi ve metiyonin sentezi için paylaşımını sağlayarak organizmanın fizyolojik fonksiyonlarında düzenleyici görev alır. MTHFR 5,10 metilentetrahidrofolatın, 5-metil tetrahidrofolata (THF) indirgenmesini katalizler. Bunun için kofaktör olarak FAD'ı kullanır [10]. 5- metil THF, metiyonin sentezi için metil grubu sağlar ve dolaylı olarak DNA metilasyonuna katılır. DNA sentezi için de, deoksiüridülatın timidilata dönüşmesinde 5,10-metil-THF gereklidir [66]. Bununla birlikte metil THF, folatın temel halkasal formudur ve homosisteinin metionine remetilasyonunda karbon donörüdür [67]. MTHFR'nin aktivitesi, dihidrofolat (DHF) ve S-adenozilmetiyoninin (SAM) bağlanması ile inhibe edilebilir (Şekil 1.10) [68].

Folatın tetrahidrofolat havuzuna tekrar girmesi sadece B vitaminine bağımlı metiyonin sentetaz reaksiyonu ile olmaktadır [69].

MTHFR aktivitesinin DNA metilasyonu, DNA tamiri ve DNA sentezindeki potansiyel etkisi MTHFR'yi kanser etkileyici gen yapmıştır [11].

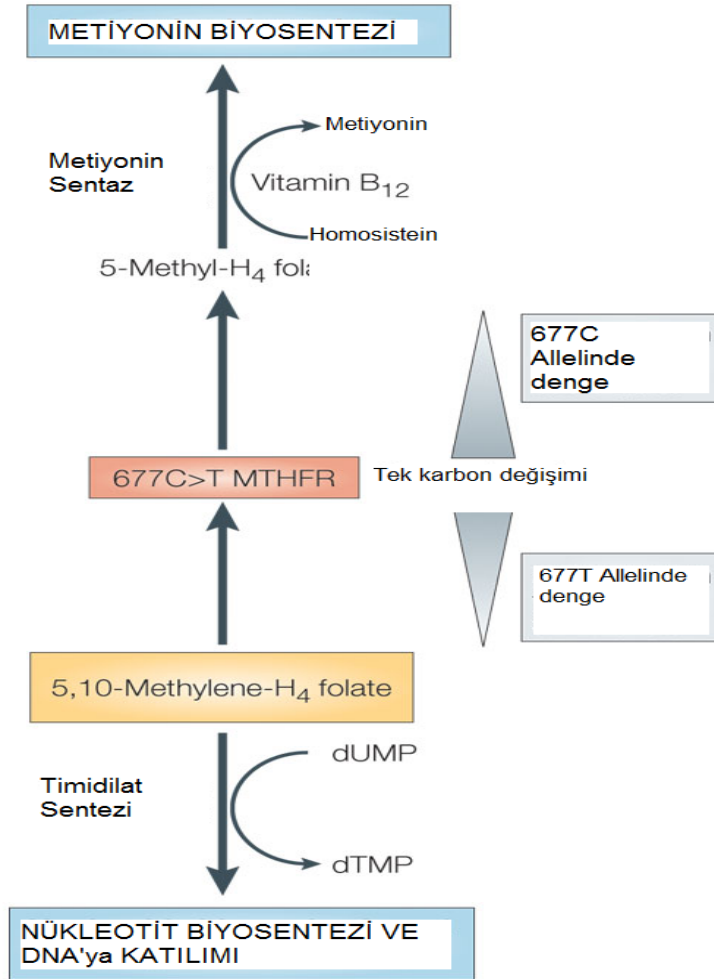


Şekil 1.10 MTHFR (Metilen tetra hidrofolat redüktaz) Metabolizması [10]

### 1.3.1.1 MTHFR Polimorfizmleri ve Hastalıklarla İlişkisi

İlk olarak, metilentetrahidrofolat redüktaz 677 C/T polimorfizmi 1995 yılında Frosst ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır [70]. 4.ekzon ve 677. baz çiftindeki sitozin\timin değişimi MTHFR'de alanin valin yer değiştirmesine ve daha sonra enzim aktivitesinde azalma (%60 oranında) ve ısıya dayanıksızlığında artmaya sebep olmaktadır [71-74].

MTHFR geninde yabancı tipe karşı C677T polimorfizmi içeren bireylerde enzim seviyelerinde farklılık gözlenir. Bu farklılıkların DNA metilasyonu ve nükleotid havuzu büyüklüğü ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. MTHFR geninin varyant formunda homozigot olarak bulunan bireyler (TT) yabancı tipe göre düşük oranda kolon kanser riski taşımaktadırlar. Yüksek oranda folat, B6 ve B12 vitamini alan TT genotipli bireylerde bu risk yabancı tipe göre %30-40 oranında azalmaktadır [67]. Bu kolorektal kanser ve lösemnin çok hızla çoğalan dokulardan meydana gelmesi ve DNA sentezine yüksek oranda gereksinim duyması ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 1.11) [75].



Şekil 1.11 MTHFR (Metilentetrahidrofolat redüktaz) 677C>T Polimorfizmi [76].

Bireylerin %15 kadarına varan bir yüzdede rastlanan bu mutasyon enzim aktivitesinin azalması ile homosistein birikimine neden olur. MTHFR enziminin aktivitesindeki bir azalma metil THF'nin azalması dolayısıyla metilen THF'nin artmasına sebep olur [73,74].

Homozigot mutant genotip (677TT) düşük serum folat, yükseltilmiş plazma homosistein, hücrelerde farklı folatların değiştirilmiş dağılımları ve koroner kalp hastalığı gibi farklı kronik rahatsızlıklarda değişik risk ve çeşitli kanserler ile bağdaştırılmıştır [70]. C677T polimorfizmine bağlı olarak meydana gelen azalmış MTHFR aktivitesi vasküler hastalıklar, nöral tüp defekti, erkek infertilitesi, down sendromu gibi farklı hastalıklarla da bağlantılı bulunmuştur [12].

MTHFR geninde ikinci sıklıkta karşılaşılan polimorfizm genin 7. ekzonunda 1298. baz çiftinde, enzimin C-terminal regülatör domaininde glutamatın alanine dönüşmesi ile sonuçlanan A-C polimorfizmidir. Homozigot varyant (CC), heterozigot varyant (AC) ve normal (AA) genotipleri oluşur. Bu polimorfizm ilk kez Viel ve arkadaşları tarafından ovaryum kanserli olgularda bulunmuştur ama daha sonra bu hastalık ile karakterize edilememiştir. Homozigot varyant genotipte %60'a varan azalan enzim aktivitesine sebep olur. Bu polimorfizmdeki allel frekansı %33'ü bulur [65,73,75].

DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmaların bipolar disorder hastalığında etkili olması ve MTHFR geninin DNA metilasyonunda görev almasından dolayı bu hastalık ile C677T mutasyonu ilişkilendirilmiş ve bu konuda Chen ve arkadaşları bir çalışma yapmışlar. MTHFR geni ile bipolar hastalığı arasında anlamlı bir bağlantı bulunamamış fakat örnek sayısının arttırılması ile ileride düzenlenecek çalışmalarda yeni sonuçlar elde edilebileceği belirtilmiştir [77].

C677T ve A1298C polimorfizmlerinin baş, boyun ve akciğer kanserleri riskini arttırdığına dair yapılan çalışmada düşük folat alınımı gerçekleşen hastalarda kanser riskini arttırdığı ama folat alınımı yüksek olan hastalarda bir risk teşkil etmediği anlaşılmıştır. Bu polimorfizmin sadece genetik olarak hastalık oluşturmadığı çevresel faktörlerle beraber etkili olduğu kanısına varılmış ve yeni çalışmalarla desteklenmesi gerektiği belirtilmiştir [73].

Diyabetik retinopati ve MTHFR mutasyonu arasında ilişkiyi inceleyen çalışmalardan farklı sonuçlar elde edilmiştir. Jiazhong ve arkadaşları, Diyabetik retinopatinin MTHFR C677T polimorfizmi ile ilişkili olduğunu ve retinopatinin ilerlemesinde etkili olduğunu bildirmiştir [78]. Klujtmans ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da paralel sonuçlar elde edilmiş ve homosisteinin damar duvarları üzerine meydana getirdiği etki diyabetik mikroanjyopati MTHFR gen mutasyonu arasında yakın ilişki ile açıklanmıştır [78]. Türkiye’de yapılan çalışmada ise Tip 2 Diyabetli bireylerde MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmleri ile diyabetik retinopati arasında ilişkinin incelenmesi ile ilgili yapılan çalışmada anlamlı bir sonuç elde edilememiştir [78].

Capecitabine ile tedavi edilen kolorektal kanserli bir grup hasta ile yapılan çalışmada C677T ve A1298C MTHFR gen polimorfizmleri ile hastalık arasında bir ilişki bulunmuş ve globüler hacimde ve homosistein seviyesinde bir artış ile plazma folat seviyesinde bir azalma gözlemlenmiştir [79]. Mide kanserli hastalarla yapılan çalışmada ise MTHFR gen mutasyonları ile bu hastalık arasında anlamlı bir bağlantı bulunamamıştır [70]. Kolon ve rektum kanser tipleri ile yapılan diğer iki çalışmada ise MTHFR TT polimorfizminin kolon ve rektum kanser riskini azalttığı ama CC ve CT genotiplerinde kanser riskinin arttığı belirtilmiştir. Folat alınımı arttıkça da bu riskin azaldığı gözlenmiştir [80,81] .

İnsan lenfosit hücreleri ile yapılan iki farklı çalışmada MTHFR varyantı hücrelere uygun besi yerinde farklı folat seviyeleri uygulanmış ve 677T varyantı olan

hücreler diğerlerine oranla daha kolay çoğalarak daha dirençli davranmışlardır. Bunun yanında 677CC ve 677CT genotiplerinin hücresel strese toleransları daha az olduğu gözlemlenmiştir. Lenfosit hücrelerine farklı folat seviyelerinde uygulanan radyasyona karşılık, folat seviyesi azaldıkça hücrelerde kromozom kırıkları ve kayıpları artmıştır [11,82].

21. Kromozom trizomili çocukları olan annelerin kontrol grup ile karşılaştırıldığında yüksek oranda T alleli içermelerinden dolayı C677T polimorfizminin, Down sendromu için maternal risk taşıdığı düşünülmektedir. 677T'nin maternal kromozom ayrılmamasına varsayılan etkisi ilk olarak oositlerde değişmiş DNA metilasyon modeli ve ikinci olarak da indirgenmiş MTHFR aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir [12].

### **1.3.1.2 MTHFR'nin Farklı Populasyonlarda Gözlemlenmesi**

C677T varyantının sıklığı etnik ve coğrafik değişimlerde oldukça fazladır. TT genotipinin yaygınlığı Amerika'daki siyah populasyonda, Sahara Afrika'sının alt kısımlarında ve Güney Amerika'da %1 iken Amerika'da yaşayan Latin ve İspanyollar, Kolombiyalı ve Brezilyadaki Amerindiya'lılarda %20'ye kadar artmaktadır. Avrupa'daki beyaz populasyon, Kuzey Amerika ve Avustralya'da TT genotipinin sıklığı %8-20 arasında değişmektedir. Avrupa'da sıklık kuzeyden güneye doğru artmaktadır. Japonlarda TT populasyonu ise % 12 kadardır [83]. 677 CT heterozigot polimorfizmi Afrikalılarda %13, İtalyanlarda %44, kuzey Amerika Kafkaslarında %44 dağılım gösterir [74].

Kuzey Amerika'da yapılan çalışmalarda A1298C polimorfizmi için CC genotipinin frekansı özellikle beyaz populasyon için % 7-12 dir. Amerika'daki İspanyol ve Latinlerde bu oran % 4 kadardır. Avrupa'da CC genotipinin sıklığı %4 ila %12 arasında değişkenlik gösterir. Çin, Japonya ve Hawaii populasyonunda bu

sıklık %1-4'tür. Brezilya, Morocco, Güney Afrika, Türkiye ve İsrail 'deki çalışmalarda sıklık sırasıyla %6, %3, %4, %6 ve %13'tür. Bazı durumlarda 3 veya 4 allel (677TT/1298AC,CT/CC, TT/CC) gözlenmiştir [83].

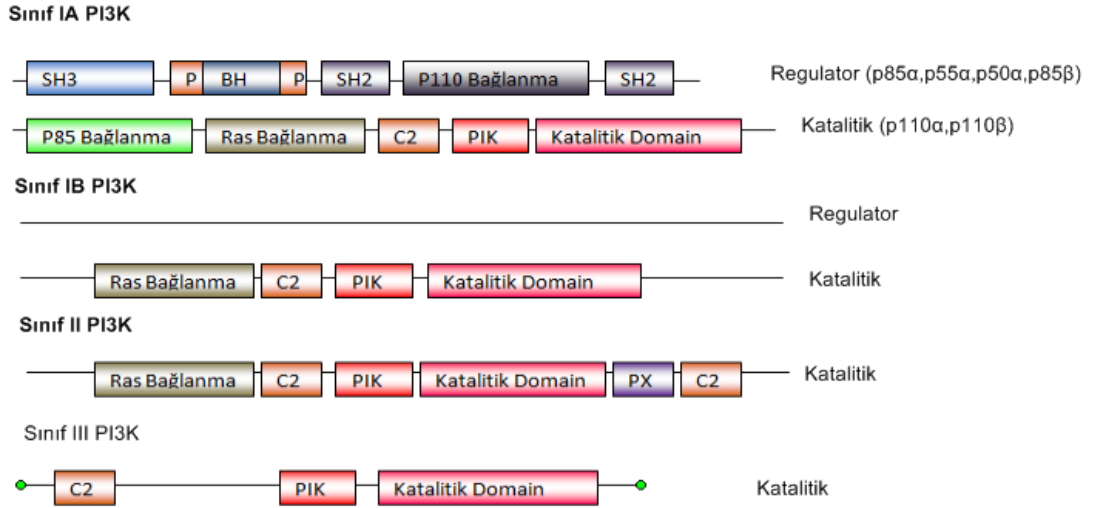
### **1.3.2 PIK3CA (Fosfatidilinositol-3-Kinaz Katalitik Alfa)**

#### **1.3.2.1 PI3K (Fosfatidilinositol Kinazlar)**

Fosfatidilinositol-3-kinazlar (PI3K), hücre çoğalmasında yer alan sinyal iletim yolları, hayatta kalma, hücre motilitesi ve adezyonu, değişim hücresel iskeletin yeniden ayarlanması ve hücreler arası trafiği düzenleyen lipid kinaz ailesidir [13]. Hem lipid hem protein kinaz aktivitesi gösterirler [84]. Memeli hücreleri üç sınıfa ayrılan PI3K'nın çoklu izoformunu içerirler (Şekil 1.12). I. Sınıf PI3K'lar bir p110 katalitik alt birim ve bir de düzenleyici adaptör alt birimden meydana gelir [14,85]. Katalitik alt birim de birkaç düzenleyici domainden oluşur ve çoğu PI3K üyeleri bu 4 bölgeyi homolog olarak paylaşır: katalitik lipid kinaz domaini, helikal domain, C2-domaini ve Ras-bağlanma domaini (RBD) ve regülör altbirimle etkileşim içinde olan NH<sub>2</sub>- terminal domaini. Katalitik lipid kinaz domaini protein kinazlarla zayıf bir homoloji gösterir (Şekil 1.12)[13].

Sınıf I PI3K'lar yapıları ve aktivasyon durumları göz önüne alınarak, sınıf Ia ve sınıf Ib olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar [13]. Sınıf Ia enzimleri regülör altbirim; p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p85 $\gamma$  ve intron kesim varyantları p55 $\alpha$  ve p50 $\alpha$  ile katalitik alt birim; p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  ya da p110 $\gamma$ 'nın heterodimerleridir [86]. Sınıf Ia PI3K'lar öncelikle hücre içi tirozin kinaz aktivitesi olan reseptörlerin, ilerisindeki sinyalleri düzenlemek ve reseptörlerle ilgili olmayan tirozin kinazlarla bağlanmakla ilişkilendirilmişlerdir [13,87].

Karsinogenez sürecinde sürekli ve kontrolsüz reseptör tirozin kinaz aktivitesi söz konusudur [88].

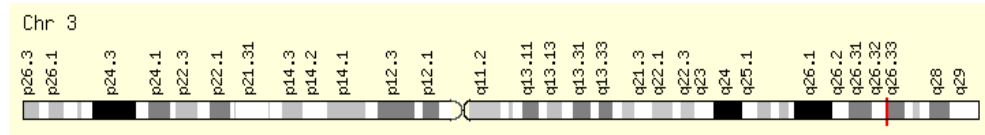


Şekil 1.12 PI3K İzofomları [89].

PI3K'lar uzun süredir kanser ile ilişkili bulunmaktadır. Bu bağlantının ilk kanıtları, Rous sarkoma virüsündeki Src protein ve polyoma virüsündeki orta T protein gibi iki onkoprotein fosfatidilinositol kinaz aktivitesi göstermesidir. PI3K'nın kanser ile bağlantısı hakkındaki en kesin kanıt, kuş retrovirüsü olan ASV16 ile yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Bu virüs bir tavukta bulunan spontan bir sarkomdan izole edilmiştir ve tavuklarda yüksek oranda tümörigendir, kültürde tavuk embriyo fibroblastlarını transforme etmektedir. P110 $\alpha$  proteinini onkogenik yapan en önemli modifikasyon, viral Gag dizisinin birleşmesi ile sağlayan membrana yönelim sinyalinin eklenmesidir [84].

### 1.3.2.2 PIK3CA (Fosfatidil İnositol 3 Kinaz Katalitik Alfa) Geni

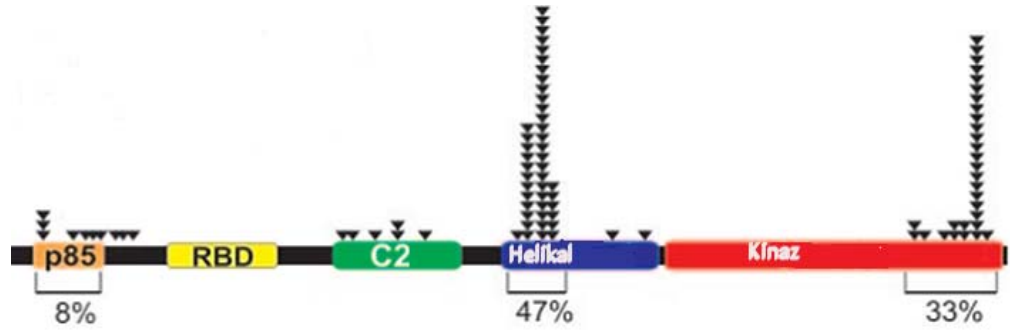
PIK3CA, fosfatidil inositol kinazın katalitik alt birimini kodlayan genidir (Şekil 1.12)[14]. Gen 3q26.3 de bulunmaktadır (Şekil 1.13) [15]. Gen 21 ekzondan oluşur ve 1068 aminoasitten oluşan 124kDa'luk proteini kodlar. Kolon, meme, beyin, karaciğer, mide ve akciğer kanseri gibi birçok kanser tipinde bu gene ait gen amplifikasyonları, delesyonları ve daha sıklıkla somatik yanlış anlamlı mutasyonları tanımlanmıştır [16,17]. PIK3CA, prostat, baş ve boyun, üriner sistem, meme, serviks ve endometrium kanser tiplerinde %30 oranında mutasyona uğramıştır [90,91]. Bu mutasyonlardan en bilinenleri helikal veya kinaz domaininde tekli aminoasit yer değişimleridir Bunlar enzimatik fonksiyonda artış dolayısıyla aktif AKT sinyal iletimi ve artmış onkogenik transformasyona neden olurlar [90]. Bu da mutant PIK3CA'nın birçok kanser tipinde önemli bir onkogen gibi davrandığını öne sürer [86].



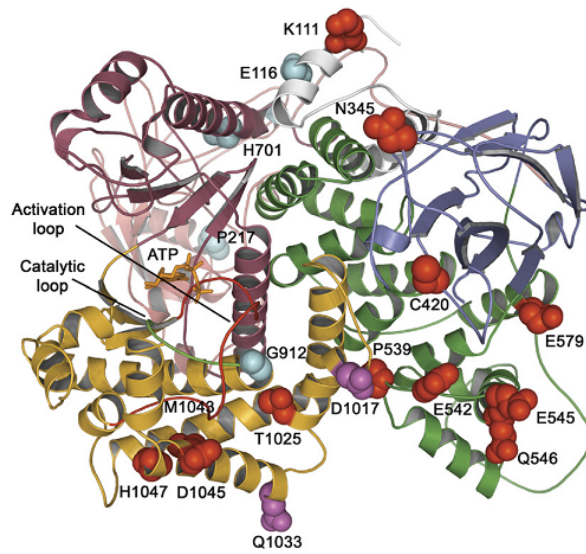
Şekil 1.13 PIK3CA'nın (Fosfatidil İnositol 3 Kinaz Katalitik Alfa) Lokalizasyonu [92].

Samuels ve arkadaşları tümör örneklerinden PIK3CA'nın tam uzunlukta dizisini çıkarttılar ve fosfatidilinositol-3-kinaz katalitik alfa (PIK3CA) genine ait somatik mutasyonları tanımladılar [93]. En sık rastlanılan mutasyonların ekzon 9 (helikal domain) ve ekzon 20 (katalitik domainin kuyruk bölgesinde) olduğunu belirttiler 74 kolorektal tümörün %32'sinde, 15 gliblastomanın %27'sinde, 12 mide kanserinin %12'sinde, 12 meme kanserinin %8'inde 24 akciğer kanserinin %4'ünde PIK3CA somatik mutasyonu tanımladılar. Buna karşın 11 pankreas kanseri ve 12 medullablastomadan hiçbirinde mutasyon tespit edilmemiştir [93].

Çalışılan kanser tiplerinde PIK3CA mutasyonları p85 domaini (ekzon 1), helikal domain (ekzon 9) ve kinaz domaini (ekzon 20) bölgelerindeki sıcak noktalarda kümelenmiştir [86,94]. Bunlar 545. (glutamik asit) aminosit ve 1047. (histidin) aminoasittir (Şekil 1.14, Şekil 1.15) [95,114,115].



Şekil 1.14 PIK3CA'daki (Fosfatidil İnositol 3 Kinaz Katalitik Alfa) Sıklıkla Karşılaşılan Mutasyonlar [93]



Şekil 1.15 PIK3CA (Fosfatidilinositol-3-Kinaz Katalitik Alfa) [95]

### 1.3.2.3 PI3K\AKT Sinyal İletim Yolu

Reseptör tirozin kinaz (RTK) aktivasyonu, reseptörün kendi kendini aktive etmesi ile başlar. İkinci aşamada ise bu fosforlanan bölgelere çeşitli adaptör proteinler bağlanırlar ve uyarının hücre içine iletimini sağlarlar. Adaptör proteinlerin ortak yapısal özelliği SH2 (Src-homology) bölgeleri içermeleridir. Bu proteinler, SH2 bölgeleri aracılığı ile reseptöre bağlanarak, RTK ile sitoplazmadaki efektör proteinleri arasında köprü görevi yapmaktadır. RTK aktivasyonunun sonlanmasında fosfataz grubu proteinler sorumludur. [88].

PI3K sinyal iletim yolu en büyük sinyal yollarından biridir [96]. p85 SH2 domaininin reseptörlerle veya diğer sinyal proteinlerle spesifik fosfotirozin residulere bağlanması PI3K'yı aktive eder ve sitosolik kompleksin plazma membranına girmesini sağlar. Membranda PI3K fosfatidilinositol-4,5-bifosfatı (PIP2) fosforile eder ve fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfata (PIP3) çevirir [13].

PIP3, PIP3-bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur [13,87,88]. Protein kinaz B (PKB) diğer adı ile Akt proteini PI3K'nın hedef proteinidir. Akt çoğalma, apoptoz ve büyümede birçok sinyal iletim yolunu da düzenleyen bir serin\treonin kinazdır [97]. PIP3, Akt ve PDK'yi membrana alır. PDK sonuç olarak Akt'ı fosforile eder ve aktifleştirir. Bu da ilerdeki birçok hedeflerini düzenler [13,87,88]. Protein kinaz B, Akt1 ve Akt2 genleri tarafından kodlanır. Sitokinler ve büyüme faktörleri PI3K ve PKB yolunu aktive ederek hücreler için yaşama sinyalleri oluştururlar [88].

Akt, PH domainindeki (N-terminal plekstrin homoloji) PIP3 etkileşimi ile sitosolden plazma membranına transloke olur ve PDK1 ve ardından PDK2 tarafından fosforile edilerek aktive edilir. Aktivasyonu takiben, Akt hücre zarından ayrılarak örneğin BAD ve mTOR'u (mammalian target of rapamycin) aktive ve fosforile ettiği

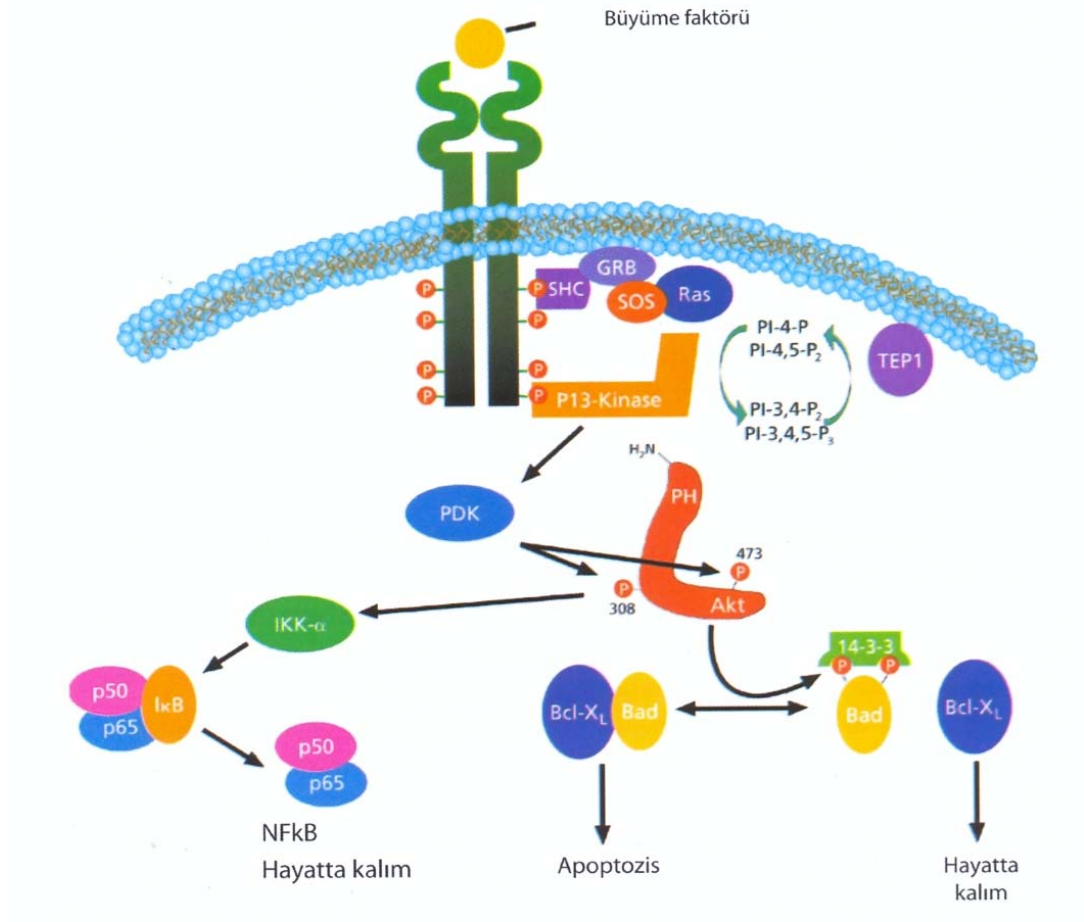
sitosole ve çekirdeğe hareket eder. BAD'ın aktivasyonu apoptozisin engellenmesi ve mTOR'un aktivasyonu hücre büyümesini etkiler [96], (Şekil 1.16).

AKT sinyal iletim yolu aynı zamanda yağ asidi sentetaz (FASN) ekspresyonunu da düzenler ve kolorektal kanser de dahil olmak üzere bir çok kanser gelişimine dahil olur [97].

PI3K-Akt sinyal iletim yolu normal hücre fonksiyonu için önemlidir ve yolağın farklı bölgelerindeki kontrol kaybı insan kanserlerinde sık rastlanmaktadır [86]. Tümör baskılayıcı proteinlerden PTEN ise, PIP3 oluşumunu engelleyerek negatif düzenleyici rol oynar [88].

Karsinogenezde etkili olan PI3K sinyal yolu değişimleri şöyle sıralanmaktadır:

- i. PI3K'nın sentezi artabilir.
- ii. PTEN tümör baskılayıcı proteini mutasyon ile fonksiyon kaybına uğrayabilir.
- iii. PKB sentezi kanser hücrelerinde (meme, over, mide, pankreas, prostat) artabilir.
- iv. PTEN'in işlev kaybı veya PKB'nin aşırı sentezlenmesi sürekli mTOR aktivasyonuna yol açmaktadır [88].



Şekil 1.16 PI3K\AKT Sinyal İletim Yolu [96]

PI3K'ların aktivasyonu, EGFR (epidermal büyüme faktörü), PDGFR (platelet-derived growth faktör reseptör) (trombositten türemiş büyüme faktörü reseptörü) ve IGFR (insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü) gibi birçok büyüme faktörü tarafından düzenlenmektedir. [86].

PI3K aktivasyonunun diğer bir modeli de Ras'ın p110 altbirimine bağlanmasıdır. Ras'ın bağlanması enzimi plazma membranına yönlendirir ve lipid kinaz aktivasyonuna yol açan katalitik domainin yapısının yeniden düzenlenmesini sağlayan konformasyonel değişiklikleri artırır [86].

## 1.4 Mutasyon Analizlerinde Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler

### 1.4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir [98]. 1980'li yılların ortalarında Cetus firması araştırmacılarından Kary Mullis tarafından geliştirilmesinin ardından temel moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi ve DNA haritalanması gibi) ve birçok hastalığın (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, "Kırılğan X" sendromu, AIDS, lösemi vb.) DNA temeline dayalı tanısı için de klinik tıpta hızla kullanılmaya başlanmıştır [96,99].

PCR ile istenilen genlerin ya da DNA dizilerinin, döngülere bağlı replikasyonu hızlandırılmış bir şekilde gerçekleştirilir. Aynen doğal hücre bölünmesinde olduğu gibi, PCR replikasyon sürecini taklit ederek yaklaşık 30 döngü sonra seçilmiş bir DNA dizisinin aşağı yukarı milyar katını kopyalar [99].

Çoğaltma son derece başarılı olabildiğinden, bazen başlangıç kalıbının bir molekül kadar az miktarının bile PCR'da çoğaltılabileceği gösterilmiştir. Bundan dolayı bir veya daha fazla hedef molekül temin eden herhangi bir DNA kaynağı prensipte PCR için kalıp olarak kullanılabilir. Kan, sperm, eski adli örnekler, atasal biyolojik örnekler gibi herhangi bir dokudan veya laboratuardaki bakteriyel kolonilerden veya faj plaklarından hazırlanan DNA kalıp işlevi görebilir [37].

Bir çift DNA primerinin her biri yaklaşık 18-30 bç uzunluğa ve benzer G+C içeriğine sahip olması gerekmektedir. Böylece primerler benzer sıcaklıklarda tamamlayıcı sekanslara tutunabilirler. Kısa oligonükleotitler için (<25bç) için bağlanma (annealing) sıcaklığı,  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$  formülü kullanılarak

hesaplanabilir [37]. Uzun primerler daha yavaş kalıp DNA ile eşleşirler ve bu da PCR etkinliğini düşürür. Pratikte 30 nükleotitten daha uzun primerler çok ender kullanılmaktadır [96].

PCR ile DNA sentezinde kullanılan enzim, kaplıca sularında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen yüksek sıcaklıklarda uzun süre kararlı olan *Taq* DNA polimerazdır. Bu enzim sayesinde, in vitro DNA çoğaltılmasında otomasyona geçilmiş ve ardışık sentez reaksiyonlarında kısa sürede yüksek miktarlarda elde edilmesi mümkün olmuştur [23,96].

PCR, tek iplikli DNA'yı kalıp alan ve deoksiribonükleotitleri substrat olarak kullanan DNA polimeraz enzimi ile gerçekleştirilir. DNA polimeraz, bütün diğer polimerazlar gibi, 5' → 3' yönünde sentez yapar ve senteze başlaması için mutlaka serbest 3'-OH grubuna gereksinim duyar. PCR'da kullanılan oligonükleotitler (primerler), enzimin senteze başlaması için bu 3'-OH grubunu sağlar. Özetle kalıp DNA, DNA polimeraz, deoksiribonükleotitler ve oligonükleotitlerin bulunduğu bir karışım, uygun koşullar sağlandığında, primerler kalıp DNA üzerinde kendilerine komplementer olan bölgelerle eşlenerek enzimin senteze başlaması için başlatıcı görev yaparlar. Daha sonra DNA polieraz, primerlerin ucuna serbest deoksiribonükleotitleri ekleyerek komplementer DNA ipliğini sentezler. Bu karışım, enzimin verimli çalışması amacıyla en uygun koşulları sağlamak için tampon bir çözelti de, genellikle 20-100µl hacimde hazırlanır [96]

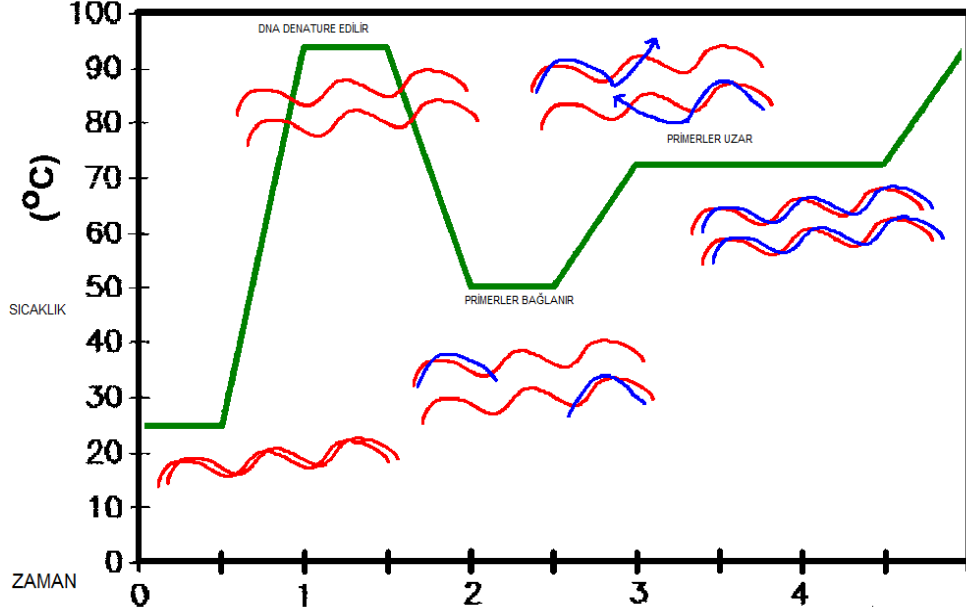


Şekil 1.17 (PCR) Polimeraz Zincir Reaksiyonu Cihazı [100].

Verimli bir PCR için (1) denaturasyon, (2) primerlerin bağlanması, (3) primerlerin uzaması, (4) döngü sayısı, (5) PCR makinesinin sıcaklık iniş ve çıkışları çok önemlidir [99]. PCR reaksiyonunun hazırlanmasından sonra, DNA sentez işlemine geçilir. PCR ile çift zincirli kalıp DNA'nın denatüre edilmesi, primerlerin kalıp DNA üzerinde kendilerine komplementer olan dizilerle eşleşmesi ve primerlerin uzatılarak yeni DNA ipliğinin sentezlenmesi işlemlerinden oluşur (Şekil 1.18). Her döngünün sonunda DNA iki katına çıkar. Bir PCR reaksiyonu genellikle 30–35 döngüden oluşur [24,96].

Başlangıç denaturasyonu için genomik DNA gibi kompleks kalıpların denature olmasını sağlamak üzere yüksek sıcaklıklar (95–100 °C) kullanılır. Ancak PCR sırasında genellikle en etkin sıcaklığın 92–95 °C olduğu saptanmıştır. Denaturasyonu ardışık primerlerin bağlanması aşamasındaki  $T_m$  bağlanma sıcaklığı oranının saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından oldukça büyük öneme sahiptir. Primerlerin uzaması aşamasında ise genellikle DNA polimerazların polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi olan 72 °C kullanılır.

Uzama aşaması için çoğu zaman iki dakika yeterli olmakla birlikte daha uzun ampliconlar çoğaltılıyorsa süre arttırılabilir [24,99].



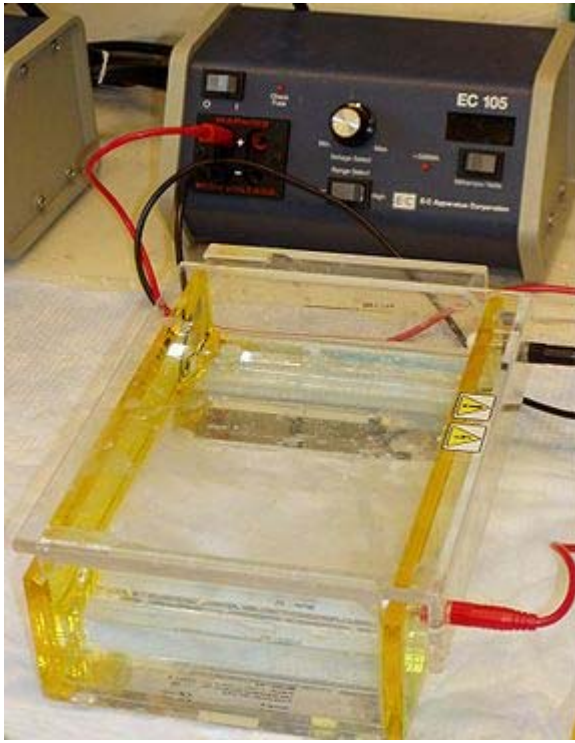
Şekil 1.18 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Sıcaklık Değişimleri [101].

#### 1.4.2 Agaroz Jel Elektrofezi

Elektroforez farklı büyüklükte, yükte ya da konformasyonda olan makromolekülleri, özellikle protein ve nükleik asitleri, ayırmak, saflaştırmak ve molekül ağırlıklarını saptamak amacıyla biyokimya ve moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [96].

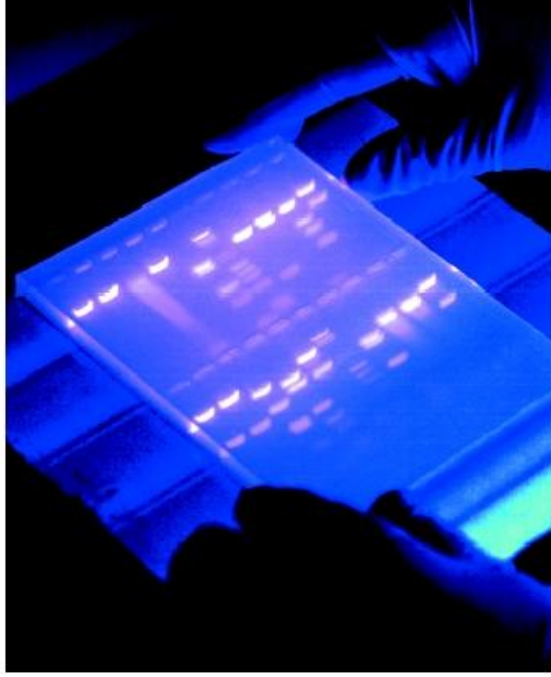
Elektroforezde yüklü moleküllerin, bir elektriksel alan uygulandığında, sıvı içeren bir ortamda hareket hızları karşılaştırılır. Eksi yüklü moleküller (anyonlar), artı yüklü elektroda (anoda), artı yüklü moleküller (katyonlar), eksi yüklü elektroda (katoda) hareket ederler [24].

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan elektroforez yöntemi, agaroz jel elektroforezidir. 200-50.000bp boyutları arasındaki DNA ve RNA moleküllerini tanımlamakta kullanılan standart yöntem destek ortamı olarak agarozun kullanıldığı elektroforezdir. Jel, elektroforez tamponuna konmuş agarozun yüksek sıcaklıkta çözündürülmesi ve ~50°C kadar soğutulması ile jel tepsilerine dökülür. Ayırımı yapılacak örnek taraklarla oluşturulmuş kuyucuklara konur ve ayırım tamamlanincaya kadar voltaj uygulanır. DNA örnekleri jel içinde göç eder [96,99].



Şekil 1.19 Agaroz Jel Elektroforezi Cihazı [102].

DNA, jeldeki etidyum bromür kapsarıyla ya da elektroforezden sonra jelin etidyum bromür çözeltisine batırılmasıyla boyanır. UV ışık ile aydınlatılınca, DNA turuncu bir bant olarak görülür [37].



Şekil 1.20 Agaroz Jel Elektroforezi Jel Görüntüsü [103].

### 1.4.3 DNA Dizi Analizi

İlk kez 1970’li yılların sonunda, hızlı ve etkili bir şekilde DNA nükleotid dizileri belirlenmeye başlandı. Bu amaçla iki farklı yöntem eş zamanlı olarak geliştirildi. Bunlardan ilki İngiltere’de Fred Sanger ve A.R. Coulson tarafından geliştirilen “zincir sonlandırma” ve diğeri ise ABD’de Allan Maxam ve Walter Gilbert tarafından geliştirilen “kimyasal yıkım” metodudur [96].

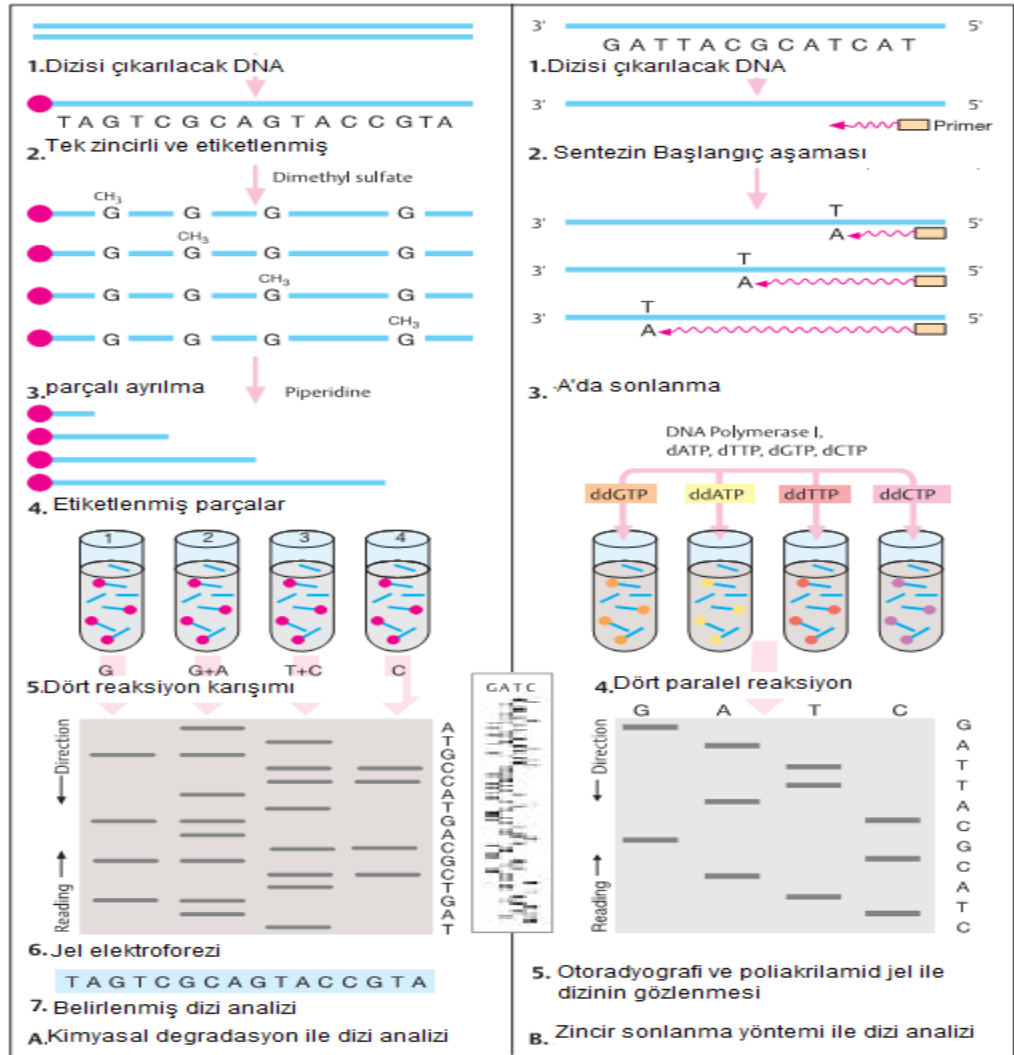
Allan Maxam ve Walter Gilbert’in kimyasal yöntemi DNA’nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır [24]. Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir [24]. Her iki yöntemde de dizisi saptanacak DNA’ya dört ayrı reaksiyon uygulanmaktadır (her baz için bir tane). Bu dört reaksiyonun ürünleri, bir

nükleotid uzunluğu kadar farklı, bir dizi DNA parçacıklarıdır. Dört reaksiyonun ürünleri bir jelde dört ayrı kuyucukta yan yana elektroforez ile ayrıştırılmaktadır. Jel hattındaki her bir bant belirli bir baza karşılık gelmektedir ve jeldeki bantlardan DNA parçacığının dizisi okunabilmektedir [24].

Maxam Gilbert'in kimyasal metodu, 5'- veya 3'- ucuna radyoaktif bir fosfatın ya da 3'- ucuna bir nükleotidin eklenmesi suretiyle dizisi çıkarılacak olan DNA kısmının bir ucundan etiketlenmesine gereksinim duyar. Metot hem tek hem çift DNA ipliği için çalışır ve iki aşamada oluşan baz spesifik kopmaları içerir. Baz önce spesifik kimyasallar kullanılarak modifiye edilir ve sonrasında piperidin DNA'nın şeker fosfat omurgasını bu yerden kopartabilir. Spesifik baz modifikasyon reaksiyonlarında guanin bazından metillemek için dimetil sülfat (DMSO) kullanılır. Formik asit, adenin ve guanin pürinlerine atak yapar. Primidinlerden hidrolize etmek için hidrazin kullanılırken, yüksek tuz ortamı timin reaksiyonunu engeller. Böylece dizi çıkarma jeli üzerindeki dört hat (G, A+G, C+T ve C) sekansın belirlenmesini sağlar [37].

Sanger metodundaki ilk basamak tek iplikli DNA elde etmektir. Bu işlem, dizi analizi yapılacak olan DNA'nın genellikle bir M13 vektörüne klonlanması ile ya da denaturasyonla yapılır. Bu aşamadan sonra DNA polimeraz I'in klenow fragmanı ya da T7 bakteriyofajı tarafından kodlanan "sequenaz" enzimi tarafından gerçekleştirilen komplementer iplik sentezi için başlangıç noktası olarak iş gören bir oligonükleotid, primer olarak kullanılır. İplik sentezi için reaksiyon karışımına enzim ve biri radyoaktif <sup>32</sup>P ile işaretli olan dört deoksiribonükleotit (dATP, dGTP, dTTP ve dCTP) ve de ayrıca modifiye nükleotit olan dideoksinükleotitler (ddATP, ddGTP, ddTTP ve ddCTP) ilave edilir. Dideoksinükleotitlerin 3'OH- ucu olmadığı için sentezlenen komplementer zincirin yapısına katılsa da sentez o noktada sonlanır. Bu şekilde dideoksinükleotitler kullanılarak sırasıyla kalıp DNA ipliğindeki guanin, sitozin, adenin ve timinlerin yerini belirleyen uzunlukta DNA parçaları sentezlenir [23,96].

Her iki yöntemde de sentez sonrası, dört reaksiyondan elde edilen radyoaktif DNA parçacıkları elektroforez jeline yan yana dört ayrı kuyucukta yürütülür. DNA bantları otoradyografi ile görüntülenir ve jel aşağıdan yukarı okunarak nükleotid dizisi saptanır [24].



Şekil 1.21 Sanger ve Maxam Gilbert Dizi Analizi Yöntemlerinin Karşılaştırılması [104].

## 1.5 Çalışmanın Amacı

Çalışmamızda PIK3CA gen mutasyonları ve MTHFR C677T polimorfizminin Türk Populasyonundaki gastrointestinal sistem kanserli olgularda incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla MTHFR geni için 103 GİS kanserli ve 105 kontrol grubuna ait kan örneği toplanmış ve istenilen bölgenin uygun primerler seçildikten sonra PCR ile çoğaltılması amaçlanmıştır. MTHFR C677T polimorfizmini araştırmak amacıyla Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak Restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizm (RFLP) analizi yapılması planlanmıştır. MTHFR C677T polimorfizmi mide ve kolon kanserli olgularda daha önce de incelenmiş olmasına rağmen pankreas ve karaciğer kanserli olgularda çalışılmamıştır. Kanserli olgu ve kontrol grubu sayımızın yüksek olmasının, çalışmamızın güvenilirliğini arttıracığı düşünülmektedir.

PIK3CA gen mutasyonlarının taranması için temin edilen 70 GİS kanserli kan örneğinin DNA izolasyonu yapılarak, uygun primerlerin seçilmesi ile 21. ekzon bölgesinin çoğaltılması planlanmıştır. Çalışmamızda 21. ekzondaki yeni mutasyonların bulunması hedeflenmiş ve bu amaçla amplifikasyon sonrası tüm dizinin incelenmesi amacıyla dizi analizi yönteminin kullanılması uygun görülmüştür. PIK3CA gen mutasyonlarının Türk Populasyonunda çalışılmamış olması ve çalışılan populasyonlarda PIK3CA genine ait 9. ve 20. ekzon bölgelerinin incelenip 21. ekzon bölgesinin incelenmemiş olması çalışmamızın özgünlüğünü arttırmaktadır.

## **2. MATERYAL VE METOT**

### **2.1 Materyal**

#### **2.1.1 Kan Örneklerinin Toplanması**

Bu çalışmada 103 farklı gastrointestinal kanserli (GİS) hasta ve 105 kontrol olmak üzere toplam 208 kan örneği kullanılmıştır. Kan örneklerinin temini Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 5. Genel Cerrahi Kliniği Ünitesi ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Kliniği Ünitesi'nden sağlanmıştır. Alınacak örneklerinin temininde Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul tarafından onaylanmış “Bilgilendirilmiş Gönüllü olur formu” kullanılmıştır (Ek-A, Ek-B).

Tüm bireylerden etik kurulda belirtilen ve onaylanan koşullara bağlı kalınarak 9ml periferik kan alınmış ve DNA eldesinde kullanılmıştır. Gastrointestinal sistem kanserlerinde PIK3CA ve MTHFR genlerindeki polimorfizmlerin Dizi Analizi ile belirlenmesi konulu tezde yapılan tüm çalışmalar, Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

## 2.1.2 Kimyasallar

### 2.1.2.1 Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

-**Eritrosit parçalama tamponu:** 1,5M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 100mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0,5M EDTA (pH:8,0).

-**Lökosit parçalama tamponu** (STE; sodyum klorid tris EDTA): 10mM Tris-HCl (pH: 7,4), 400mM NaCl ve 2mM EDTA (pH: 8,0).

-**Proteinaz K** (20mg/ml): 0,2g proteinaz K, 10ml TE tamponu.

-**%10' luk Sodyum Dodesil Sülfat** (SDS): 10gr SDS 100ml steril distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

-**Fenol: kloroform: izoamilalkol** (25:24:1) çözeltisi: Fenol, kloroform ve izoamil alkol verilen oranlarda karıştırılarak elde edilmiştir ve kullanılmadan önce 24 saat  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir.

-**2M Sodyum asetat** ( $\text{NaCH}_3\text{CO}_2$ ) Çözeltisi: 1,64gr sodyum asetat, 100ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

-**%70'lik ve %95'lik etil alkol çözeltileri**

-**TE çözeltisi:** 10mM Tris (pH: 8,0), 1mM EDTA (pH: 8,0).

### 2.1.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

—**Taq polimeraz tamponu 5x:** GoTaq Flexi (Promega)

—**Magnezyum Klorür ( $\text{MgCl}_2$ ):** 25mM (Promega)

—**Nükleotit Karışımı:** 10mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) (Promega)

—**Taq polimeraz:** 5U/ $\mu\text{l}$  (Promega)

—**Primerler:** Çalışmada kullanılan primerler Çizelge3.3 ve Çizelge 3.4’de verilmiştir.

### **2.1.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler**

-**Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE) tamponu (x50) (pH: 8,0):** 242g Tris, 57,1ml glacial asetik asit, 0,5M 100ml EDTA (pH 8,0) distile su içerisinde çözülerek hacim 1000ml’ye tamamlanmıştır.

-**Agaroz:** %0,8 ve %2’lik agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.

-**Yükleme tamponu:** 40g. sükroz, 0,025g. bromofenol mavisi, 0,25g. ksilen siyanol 100ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

-**Etidyum bromür:** 10mg/ml

### **2.1.2.4 Hinf 1 ile kesim için Gerekli Kimyasallar**

-**Hinf1 Enzimi:** BIORON marka restriksiyon enzimi, tamponu ve Steril distile su.

### 2.1.3 Laboratuvar Gereçleri

Çizelge 2.1 Laboratuvar Gereçleri

<b>KULLANILAN GEREÇ</b>	<b>MODELİ</b>
<b>-80<sup>0</sup>C Derin Dondurucu</b>	SANYO
<b>-30<sup>0</sup>C Derin Dondurucu</b>	SANYO biomedical
<b>Buzdolabı (+4<sup>0</sup>C)</b>	SANYO medicool
<b>Buz Makinesi</b>	Hoshizaki
<b>Elektronik Tartı</b>	Scaltec SP051
<b>Hassas Terazi</b>	Sartorius
<b>Otoklav</b>	Tomy SX-700E
<b>Benmari Sıcak Su Banyosu</b>	FALC
<b>Santrifüj</b>	Hettich mikro 22R, Hettich 320 R
<b>PCR</b>	Biometra Thermocycler
<b>Mikrodalga Fırın</b>	Vestel
<b>Ph Metre</b>	Mettler Toledo seven multi
<b>Vortex</b>	Fisons Whirlimixer
<b>Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı</b>	Electro mag
<b>Jel Görüntüleme Sistemi</b>	Biometra Biodoc Analyze
<b>Spektrofotometre</b>	Nano drop ND-1000
<b>Saf Su Cihazı</b>	Jencons
<b>Mikropipetler</b>	Gilson Pipettman

## 2.2 Metot

### 2.2.1 DNA İzolasyonu

Hastalardan ve kontrol grubundan alınan 9ml'lik periferik kan örnekleri içinde 1ml EDTA bulunan tüplere alınmıştır. Tüplerdeki kanlar hafifçe altüst edildikten sonra 50ml'lik falkon tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine hacimlerinin 2,5 katı kadar Eritrosit parçalama tamponu eklenmiştir. Falkon tüpleri de çalkalandıktan sonra 20dk buz üzerinde bekletilmiştir. Örnekler daha sonra 4000rpm'de 4<sup>0</sup>C'de 20dk santrifüj edilerek parçalanmış kan hücreleri ile Eritrosit parçalama tamponunun birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Ardından üstteki süpernatant dökülerek hacmin 2,5 katı Eritrosit parçalama tamponu yeniden eklenerek santrifüj edilmiştir. Bu işleme tüpün dibinde parçalanmış kırmızı kan hücrelerinin üzerinde beyaz lökosit tabakası görülene kadar devam edilmiştir. Süpernatantın dökülmesinden sonra kalan pelletin üzerine 1000µl Eritrosit parçalama tamponu ilave edilmiş ve vorteksle homojen hale getirilmiştir. Falkon tüpünden 200µl örnek 1.5ml'lik eppendorf tüpüne alınıp işleme devam edilmiş geriye kalan örnek stoklanmıştır. İşlem yapılacak eppendorf tüpüne 500µl STE, 30µl SDS (%10'luk), 20µl Proteinaz K ilave edilmiş ve bir gece 56<sup>0</sup>C su banyosunda bekletilmiştir. İkinci gün örneğin üzerine 750µl fenol:kloroform:izoamil alkol ilave edilmiş ve 10dk elde alt üst edilerek çalkalanmıştır. Ardından örnekler 20dk buzda bekletilmiştir. 4000rpm'de 4<sup>0</sup>C'de 20dk santrifüj edildikten sonra oluşan 2 fazdan üst kısım pipet ile yeni bir tüpe aktarılmış, üzerine de 1:1 oranında kloroform ilave edilmiştir. Örnek 10dk elde alt üst edilerek çalkalandıktan sonra 20 dk buzda bekletilmiştir. 4000rpm'de 4<sup>0</sup>C'de 20dk santrifüj edildikten sonra süpernatant yine pipet yardımı ile dikkatlice başka bir eppendorfa alınmıştır. Hacmin 1\10'u kadar Na asetat ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik etanol ilave edilip DNA iplikçikleri beyaz yumak şeklinde görünür hale gelinceye dek tüp yavaşça alt üst edilmiştir. Örnek -20<sup>0</sup>C'de 1 gece bekletilmiştir. Üçüncü gün örnek 4000rpm'de 4<sup>0</sup>C'de 20dk santrifüj edildikten sonra sıvı kısım dökülmüştür. Tüpe 500µl %70'lik etanol ilave edilip 20dk 4000rpm'de 4<sup>0</sup>C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası alkol dikkatlice dökülüp kurumaya örnek

bırakılmıştır. 2. Günün son aşamasında DNA yumağının görünürlüğü oranına göre 100–400 µl aralığında TE ilave edilip 37 °C su banyosunda bir gece bekletilmiştir.

### **2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

PIK3CA geni 21. ekzon bölgesinin amplifikasyonu için örnek başına 5X'lik Taq Polimeraz tamponundan 5µl, 4 µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 1µldNTP, 1µl primer, 1µl kalıp DNA ve 0,2µl Taq enzimi eklenmiş ve reaksiyon hacmi steril distile su ile 50µl'ye tamamlanmıştır.

MTHFR geninin amplifikasyonu için için örnek başına 5x'lik Taq Polimeraz tamponundan 10µl, 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1µl dNTP, 1µl primer, 1µl kalıp DNA ve 0,1µl Taq enzimi eklenmiş ve reaksiyon hacmi steril distile su ile 50µl'ye tamamlanmıştır.

### **2.2.3 Jel Elektroforezi**

PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Bunun için 0,6gr agar 30ml 1x TAE içinde çözülmüş ve mikrodalga fırında kaynatılmıştır. 3µl etidyum bromid eklenerek jel kasedine dökülmüş, uygun tarak takılarak kuyucukların oluşması sağlanmıştır. 30 dakika kadar beklenip jelin polimerizasyonu sağlandıktan sonra tarak jelden ayrılmış ve kaset agaroz jel elektroforez tankına (BIOMETRA) yerleştirilmiştir. 1x TAE tamponu jelin üzerini geçene kadar tanka eklenmiştir. İlk kuyucuğa 2µl DNA marker, diğer kuyucuklara da 10µl PCR ürünü 2-4µl yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir. Örnekler 30 dakika 80V'luk bir voltaj uygulanarak yürütülmüştür. Yürütme işleminin ardından PCR ürünleri Biometra BioDoc Analyze görüntüleme cihazı ile UV ışık altında görüntülenmiştir.

#### 2.2.4 Restriksiyon Endonükleaz Analizi

MTHFR C677T bölgesinde C-T değişimi HinfI enzimi için (GANTC) restriksiyon bölgesi oluşturur. Çoğaltılan PCR ürünü HinfI enzimi ile kesilerek bu polimorfizim tanımlanması gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla HinfI enzim kesimi izelge 2.2’de belirtilen şekilde gerçekleştirildi ve 37°C ’de 24 saat kesime bırakıldı. Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, dijital görüntüleme sisteminde değerlendirildi (Bölüm 2.2.3).

Çizelge 2.2 Restriksiyon Endonükleaz Kesim Reaksiyonu

Reaksiyon İçeriği	Miktar
PCR ürünü	8 µl
Tampon	1 µl
Hinf I Enzimi	0,5 µl
dH <sub>2</sub> O	0,5 µl
TOPLAM	10 µl

#### 2.2.5 Dizi Analizi

Elde edilen PCR ürünleri Qiagen PCR Purification Kit (PCR Saflaştırma Kiti) ile purifiye edildikten sonra dizi analizi MACROGEN COMPANY, Kore tarafından yapılmıştır.

### 2.2.6 Biyoinformatik Analizi

Dizi analizi sonuçlarının analizi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> adresinde BLAST ve ALIGNMENT uygulamaları kullanılarak yapılmıştır.

### 3. BULGULAR

Bu tez çalışmasında PIK3CA ve MTHFR için farklı sayıda kolorektal, mide, pankreas ve karaciğer olmak üzere gastrointestinal sistem kanser hastalarına ait kan örnekleri toplanmıştır. Ayrıca karşılaştırmalı analiz için, herhangi bir kanser tanısı bulunmayan 105 tane kontrol grubuna ait kan örneği çalışılmıştır (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2). Kan örneklerinin temini Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 5. Genel Cerrahi Kliniği Ünitesi ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Kliniği Ünitesi'nden sağlanmıştır. Alınacak örneklere dair hastalar çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul tarafından onaylanmış “Bilgilendirilmiş Gönüllü olur formu” ile izinleri alınmıştır.

Hasta olan bireylerin kan örneklerinin temin edildiği birimlerce patolojik tanıları konmuştur Hastalar bu kliniklerce takip edilmekte olan yatan hastalardır. Kontrol grubu olarak kan örnekleri temin edilen kişiler herhangi bir belirgin rahatsızlığı olmayan popülasyonda tesadüfi olarak tüm yaş aralıklarından seçilmiş bireylerden oluşmaktadır. Kontrol grubu 32 kadın, 73 erkek bireylerden oluşmuştur (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2)

Çizelge 3.1 PIK3CA Polimorfizm Analizinde Çalışılan Hastalar

	Bayan	Yüzde	Erkek	Yüzde	Toplam
Kolorektal Kanser	9	45%	11	%55	20
Mide Kanseri	9	34,6%	17	%65,4	26
Pankreas Kanseri	5	50%	5	%50	10
Karaciğer Kanseri	2	14,2%	12	%85,8	14
Toplam	25		45		70

Çizelge 3.2 MTHFR Polimorfizm Analizinde Çalışılan Hasta ve Kontrol Grubu

	Bayan	Yüzde	Erkek	Yüzde	Toplam
Kolorektal Kanser	13	34,20%	25	65,80%	38
Mide Kanseri	9	31%	20	69%	29
Pankreas Kanseri	8	53,30%	7	56,70%	15
Karaciğer Kanseri	4	19%	17	81%	21
Toplam	34		69		103

Çalışmamız PIK3CA ve MTHFR genlerine ait polimorfizmlerin belirlenmesini kapsayan iki kısımdan oluşmaktadır. Çalışmanın ilk bölümünde farklı gastrointestinal kanser çeşitleri içeren 70 adet GİS kanserli olguya ait örnekten genomik DNA izolasyonu yapılarak, spesifik PIK3CA bölgesi (3.kromozomun q kolunun 26.3. bandında yer alan PIK3CA (fosfatidilinositol-3-kinaz) proto-onkogeninin 21. ekzonu) çoğaltılmış, ve dizi analizine tabi tutularak nükleotit polimorfizmlerinin durumuna bakılmıştır.

Çalışmanın ikinci bölümünde GIS kanserli olguların tümü yani 103 kan örneği ve kontrol grubuna ait 105 kan örneği kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapılmış, MTHFR genine ait bölge çoğaltılmış (1. kromozomun p kolunun 36.3. bandında yer alan MTHFR proto-onkogeninin 4. ekzonu) ve RFLP Analizine tabi tutularak polimorfizm durumları belirlenmiştir.

### **3.1 PIK3CA Proto-onkogeninin 21. Ekzon Bölgesine Ait PCR ve DNA Dizi Analizi Sonuçları**

PIK3CA'nın ekzon 21 bölgesini çoğaltmak için, PIK3CA proto-onkogeninin 21. ekzon bölgesine ait primerlerin yerleşim bölgeleri ve DNA dizi analizi yapılan

PIK3CA proto-onkogeninin 21. Ekzon bölgesine ait gen bankasından alınmış PIK3CA cDNA dizisi (Gen kayıt numarası: NM\_006218) Çizelge 3.5’de gösterilmiştir. PIK3CA proto-onkogeninin 21. Ekzon bölgesi Çizelge 3.3’deki primerler kullanılarak. Kullanılan döngü koşulları Çizelge 3.4’te belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri marker varlığında jelde yürütülmüş ve büyüklüğü 175 bç olarak gözlemlenmiştir (Şekil 3.1)

Çizelge 3.3 PIK3CA ekzon 21 [94] Bölgesinin Çoğaltılması İçin Kullanılan Primerler, Bağlanma Sıcaklıkları ve PCR Ürünlerinin Büyüklükleri

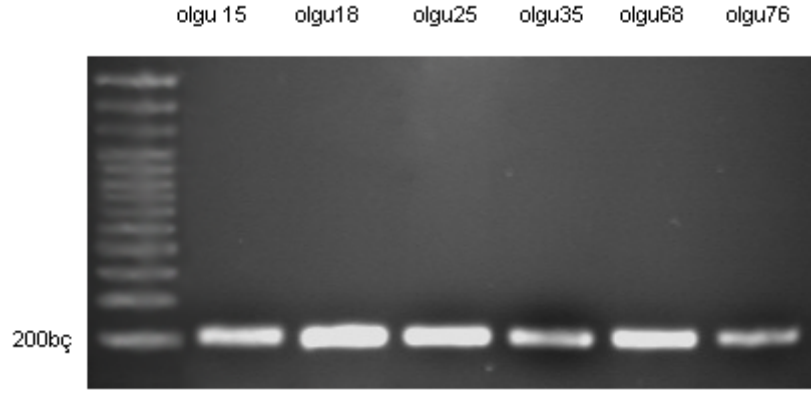
Gen	Nukleotit dizimi (5’-3’)	tm	PCR ürün
PIK3CA	21 F: 5’-CTC TGG AAT GCC AGA ACT AC-3’	52.7 <sup>0</sup> C	175bç
	21 R: 5’-ATG CTG TTT AAT TGT GTG GAA G-3’	51.7 <sup>0</sup> C	

Çizelge 3.4 PIK3CA Ekzon 21 in Çoğaltılması için Kullanılan PCR programı

Sıcaklık	Süre	Döngü
95 <sup>0</sup> C	2dk	
94 <sup>0</sup> C	30sn	35 döngü
56 <sup>0</sup> C	30sn	
72 <sup>0</sup> C	45sn	
72 <sup>0</sup> C	10dk	

Çizelge 3.5 PIK3CA mRNA Dizisi, Kullanılan Primerlerin Yerleşim Bölgeleri (Pembe ile Gösterilen), Çoğaltılan Bölge (Mavi ile Gösterilen) [105]. Gen Kayıt numarası:NM\_006218

1	TCTCCCTCGG	CGCCGCCGCC	GCCGCCCGCG	GGGCTGGGAC	CCGATGCGGT	TAGAGCCGCG
61	GAGCCTGGAA	GAGCCCCGAG	CGTTTCTGCT	TTGGGACAAC	CATACATCTA	ATTCCTTAAA
121	GTAGTTTTAT	ATGTAAAAC	TGCAAAGAAT	CAGAACAATG	CCTCCACGAC	CATCATCAGG
181	TGAACTGTGG	GGCATCCACT	TGATGCCCCC	AAGAATCCTA	GTAGAATGTT	TACTACCAA
241	TGGAATGATA	GTGACTTTAG	AATGCCCTCCG	TGAGGCTACA	TTAATAACCA	TAAAGCATGA
301	ACTATTTAAA	GAAGCAAGAA	AATACCCCTT	CCATCAACTT	CTTCAAGATG	AATCTTCTTA
361	CATTTTCGTA	AGTGTTACTC	AAGAAGCAGA	AAGGGAGAA	TTTTTTGATG	AAACAAGACG
421	ACTTTGTGAC	CTTCGGCTTT	TTCAACCCTT	TTTAAAAGTA	ATTGAACCAG	TAGGCAACCG
481	TGAAAGAAAAG	ATCCTCAATC	GAGAAAATGG	TTTTGCTATC	GGCATGCCAG	TGTGTGAATT
541	TGATATGGTT	AAAGATCCAG	AAGTACAGGA	CTTCCGAAGA	AATATTCTGA	ACGTTTGTAA
601	AGAAGCTGTG	GATCTTAGGG	ACCTCAATTC	ACCTCATAGT	AGAGCAATGT	ATGTCTATCC
661	TCCAAATGTA	GAATCTTCAC	CAGAATTGCC	AAAGCACATA	TATAATAAAT	TAGATAAAGG
721	GCAAATAATA	GTGGTATAGT	GGTAAATAGT	TTCTCCAAAT	AATGACAAGC	AGAAGTATAC
781	TCTGAAAATC	AACCATGACT	GTGTACCAGA	ACAAGTAATT	GCTGAAGCAA	TCAGGAAAAA
841	AACTCGAAGT	ATGTTGCTAT	CCTCTGAACA	ACTAAAAC	TGTGTTTTAG	AATATCAGGG
901	CAAGTATATT	TTAAAAGTGT	GTGGATGTGA	TGAATACTTC	CTAGAAAAAT	ATCCTCTGAG
961	TCAGTATAAG	TATATAAGAA	GCTGTATAAT	GCTTGGGAGG	ATGCCCAATT	TGATGTTGAT
1021	GGCTAAAGAA	AGCCTTTATT	CTCAACTGCC	AATGGACTGT	TTTACAATGC	CATCTTATTC
1081	CAGACGCATT	TCCACAGCTA	CACCATATAT	GAATGGAGAA	ACATCTACAA	AATCCCTTTG
1141	GGTTATAAAT	AGTGCACCTA	GAATAAAAAA	TCTTTGTGCA	ACCTACGTGA	ATGTAATAAT
1201	TCGAGACATT	GATAAGATCT	ATGTTCAAGC	AGGTATCTAC	CATGGAGGAG	AACCTTATAG
1261	TGACAAATGTG	AACACTCAAA	GAGTACCTTG	TTCCAATCCC	AGGTGGAATG	AATGGCTGAA
1321	TTATGATATA	TACATTCCCTG	ATCTTCCCTCG	TGCTGCTCGA	CTTTGCTTTT	CCATTTGCTC
1381	TGTTAAAGGC	CGAAAGGGTG	CTAAAGAGGA	ACACTGTCCA	TTGGCATGGG	GAAATATAAA
1441	CTTGTTTGAT	TACACAGACA	CTCTAGTATC	TGGAAAATG	GCTTTGAATC	TTTGGCCAGT
1501	ACCTCATGGA	TTAGAAGATT	TGCTGAACCC	TATTGGTGTT	ACTGGATCAA	ATCCAAATAA
1561	AGAACTCCA	TGCTTAGAGT	TGAGATTGGA	CTGGTTCAGC	AGTGTGGTAA	AGTTCCCGA
1621	TATGTCAGTG	ATTGAAGAGC	ATGCCAATTG	GCTCTGTATC	CGAGAAGCAG	GATTTAGCTA
1681	TTCCACACGCA	GGACTGAGTA	ACAGACTAGC	TAGAGACAAT	GAATTAAGGG	AAAATGACAA
1741	AGAACAGCTC	AAAGCAATTT	CTACACGAGA	TCTCTCTCT	GAAATCACTG	AGCAGGAGAA
1801	AGATTTTCTA	TGGAGTCACA	GACACTATTG	TGTAACATATC	CCCGAAATTC	TACCCAAATT
1861	GCTTCTGTCT	GTTAAATGGA	ATTCTAGAGA	TGAAGTAGCC	CAGATGTATT	GCTTGGTAAA
1921	AGATTGGCCT	CCAATCAAAC	CTGAACAGGC	TATGGAATCC	CTGGACTGTA	ATTACCAGAA
1981	TCCTATGGTT	CGAGGTTTTG	CTGTTCCGGT	CTTGGAAAAA	TATTTAACAG	ATGACAAACT
2041	TTCTCAGTAT	TTAATTCAGC	TAGTACAGGT	CCTAAAATAT	GAACAATATT	TGGATAACTT
2101	GCTTGTGAGA	TTTTTACTGA	AGAAAGCATT	GACTAATCAA	AGGATGGGGC	ACTTTTCTT
2161	TTGGCATTTA	AAATCTGAGA	TGCACAATAA	AACAGTTAGC	CAGAGGTTTG	GCCTGCTTTT
2221	GGAGTCCTAT	TGTCGTGCAT	GTGGGATGTA	TTTGAAGCAC	CTGAATAGGC	AAGTCGAGGC
2281	AATGGAAAAG	CTCATTAAC	TAACTGACAT	TCTCAAACAG	GAGAAGAAGG	ATGAAACACA
2341	AAAGGTACAG	ATGAAGTTTT	TAGTTGAGCA	AATGAGGCCA	CCAGATTTCA	TGGATGCTCT
2401	ACAGGGCTTT	CTGTCCTCTG	TAAACCCTGC	TCATCAACTA	GGAACCTCA	GGCTGGAAGA
2461	GTGTCGAATT	ATGTCCTCTG	CAAAAAGGCC	ACTGTGGTTG	AATTGGGAGA	ACCCAGACAT
2521	CATGTCAGAG	TTACTGTTTC	AGAACAATGA	GATCATCTTT	AAAAATGGGG	ATGATTTACG
2581	GCAAGATATG	CTAACACTTC	AAATTATTTCG	TATTATGGAA	AATATCTGGC	AAAAACAAGG
2641	TCTTGATCTT	CGAATGTTAC	CTTATGGTTG	TCTGTCAATC	GGTGACTGTG	TGGGACTTAT
2701	TGAGGTGGTG	CGAAATTCTC	ACACTATTAT	GCAAAATCAG	TGCAAAAGCG	GCTTGAAAGG
2761	TGCACTGCAG	TTCAACAGCC	ACACACTACA	TCAGTGGCTC	AAAGACAAGA	ACAAAGGAGA
2821	AATATATGAT	GCAGCCATTG	ACCTGTTTAC	ACGTTTCATG	GCTGGATACT	GTGTAGCTAC
2881	CTTCATTTTG	GAATTTGAG	ATCGTCACAA	TAGTAACATC	ATGGTGAAG	ACGATGGACA
2941	ACTGTTTTCAT	ATAGATTTTG	GACACTTTTT	GGATCACAAG	AAGAAAAAAT	TTGGTTATAA
3001	ACGAGAACGT	GTGCCATTTG	TTTTGACACA	GGATTTCTTA	ATAGTGATTA	GTAAGGAGC
3061	CCAAGAATGC	ACAAAGACAA	GAGAATTTGA	GAGGTTTCAG	GAGATGTGTT	ACAAGGCTTA
3121	TCTAGCTATT	CGACAGCATG	CCAATCTCTT	CATAAATCTT	TTCTCAATGA	TGCTTGGCTC
3181	TGGAATGCCA	GAACTACAA	CTTTTGATGA	CATTGCATCA	ATTCGAAAGA	CCCTAGCCTT
3241	AGATAAAACT	GAGCAAGAGG	CTTTGGAGTA	TTTCATGAAA	CAAATGAATG	ATGCACATCA
3301	TGGTGGCTGG	ACAACAATAA	TGGATTGGAT	CTTCCACACA	ATTAACAGC	ATGCATTTGAA
3361	CTGAAAAGAT	AACTGAGAAA	ATGAAAGCTC	ACTCTGGATT	CCACACTGCA	CTGTTAATAA
3421	CTCTCAGCAG	GCAAAGACCG	ATTGCATAGG	AATTGCACAA	TCCATGAACA	GCATTAAGAA
3481	TTACAGCAAG	AACAGAAATA	AAATACTATA	TAATTTAAAT	AATGTAAACG	CAAACAGGGT
3541	TTGATAGCAC	TTAAACTAGT	TCATTTCAAA	ATTAAGCTTT	AGAATAATGC	GCAATTTTCAT
3601	GTTATGCCTT	AAGTCCAAAA	AGGTAAACTT	TGAAGATTGT	TTGTATCTTT	TTTTAAAAAA
3661	CAAAAACAAA	CAAAAATCCC	CAAAAATATAT	AGAAAATGATG	GAGAAGGAAA	AAAAAATAAA
3721	AAAA					



Şekil 3.1 PIK3CA PCR Ürünü Jel Görüntüsü

PCR ürünlerinin saflaştırılmasından sonra örneklerin dizi analizi ticari firma aracılığı ile yapılmıştır. Forward ve Reverse primerleri kullanılarak elde edilen dizi analizleri sonucunda elde dizi, NCBI'daki PIK3CA cDNA dizisi (NM\_006218) BLAST analizi ile biyoinformatik olarak karşılaştırılmıştır. Örnek olarak.14. olguya ait PIK3CA dizisi ile yapılan karşılaştırma Şekil 3.2'de görüldüğü gibi yapılmıştır. İncelemiş olduğumuz 70 adet farklı gastrointestinal kanserli olgularda PIK3CA ekzon 21'de polimorfizm tespit edilememiştir. Herhangi bir polimorfizm bulunmaması, bu bölgenin GIS kanserli olgularda bir korrelasyon göstermediği anlamına geldiği için kontrol grubu örneklerinde planlanan analiz yapılmamıştır.

```

>lcl|14423
Length=175

Score = 316 bits (350), Expect = 1e-91
Identities = 175/175 (100%), Gaps = 0/175 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   CTCTGGAATGCCAGAACTACAATCTTTTGATGACATTGCATACATTGAAAAGACCCTAGC 60
          |||
Sbjct 1   CTCTGGAATGCCAGAACTACAATCTTTTGATGACATTGCATACATTGAAAAGACCCTAGC 60

Query 61   CTTAGATAAAACTGAGCAAGAGGCTTTGGAGTATTCATGAAACAAATGAATGATGCACA 120
          |||
Sbjct 61   CTTAGATAAAACTGAGCAAGAGGCTTTGGAGTATTCATGAAACAAATGAATGATGCACA 120

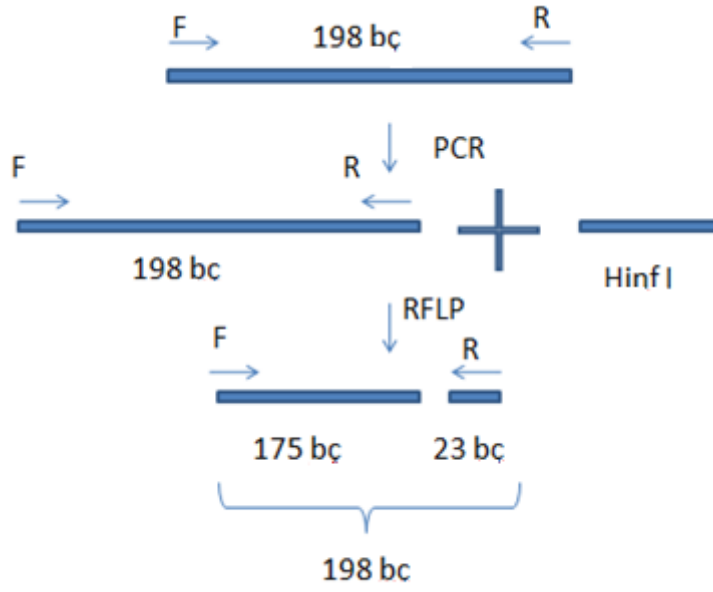
Query 121  TCATGGTGGCTGGACAACAAAATGGATTGGATCTCCACACAATTAACAGCAT 175
          |||
Sbjct 121  TCATGGTGGCTGGACAACAAAATGGATTGGATCTCCACACAATTAACAGCAT 175

```

Şekil 3.2 14. Olguya Ait BLAST Analizi Görüntüsü

### 3.2 MTHFR Proto-onkogeninin C677T Bölgesinin RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi

MTHFR genindeki polimorfizminin belirlenmesi için, PCR-RFLP analizi yapıldı. Buna göre MTHFR geninin 198bp'lik bir bölge PCR ile genomik DNA'dan çoğaltılmıştır. DNA'sı elde edilen hasta ve kontrol grubu olgularına MTHFR proto-onkogeninin 4. Ekzonunun çoğaltılması için Çizelge 3.6'da verilen primer dizileri kullanılarak, Çizelge 3.7'de gösterilen polimeraz zincir reaksiyonu uygulanmıştır. PCR ürünleri marker varlığında %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve büyüklüğü 198 bp olarak gözlemlenmiştir. . Elde edilen ürün Hinfl restriksiyon enzimiyle kesilerek elde edilen bantların varlığına göre genotiplemeye gidilmiştir (Şekil 3.3, Şekil 3.4).



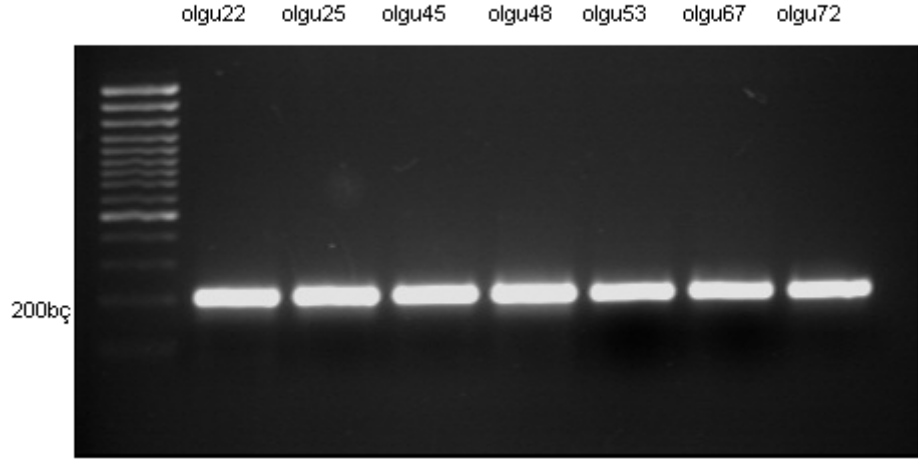
Şekil 3.3 PCR-RFLP Analizi

Çizelge 3.6 MTHFR Geninin Çoğaltılması için Kullanılan Primerler [66].

Gen	Nukleotit dizimi (5'-3')	tm	PCR ürün
MTHFR	F: 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3'	62.1 <sup>0</sup> C	198bc
	R: 5'-AAG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'	61.8 <sup>0</sup> C	

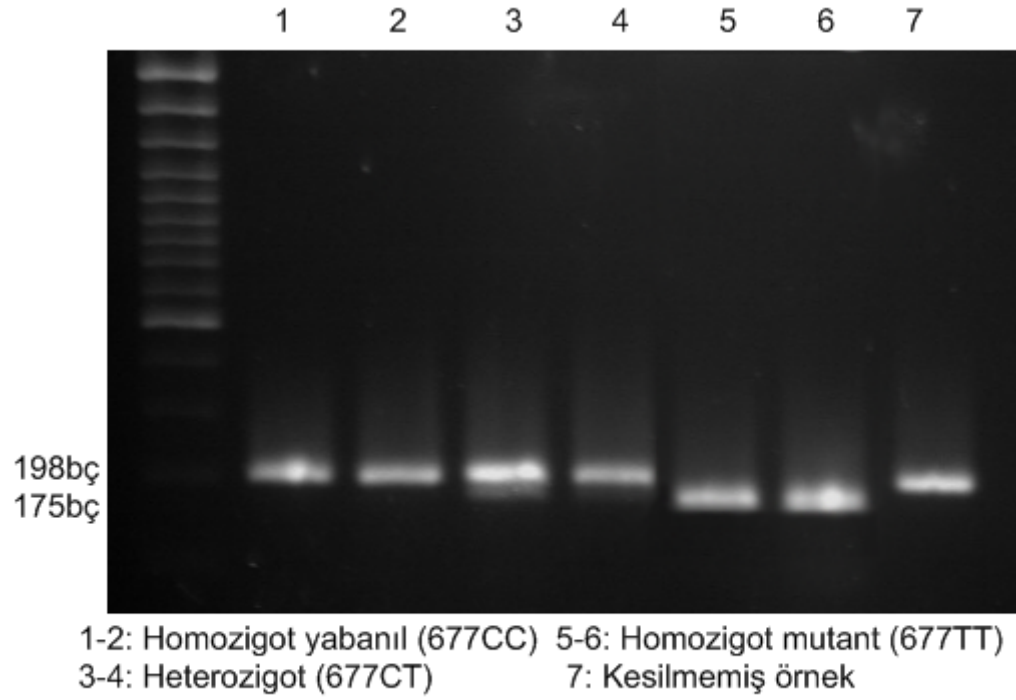
Çizelge 3.7 MTHFR Geninin Çoğaltılması için Kullanılan PCR Programı

Sıcaklık	Süre	Döngü
94 <sup>0</sup> C	2dk	
94 <sup>0</sup> C	30sn	40 döngü
62 <sup>0</sup> C	30sn	
72 <sup>0</sup> C	45sn	
72 <sup>0</sup> C	7dk	



Şekil 3.4 MTHFR PCR Ürünü jel Görüntüsü

PCR ürünleri Hinf I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Bu kesim sonucunda 677CC homozigot yabanıl, 677CT heterozigot ve 677CC homozigot mutant olmak üzere 3 farklı tip genotip oluşmaktadır. Kesim reaksiyonu sonucu örnekler %2'lik agaroz jelde yürütüldüğünde 3 farklı görüntü oluşmaktadır. Sadece 198 bç uzunluğunda oluşan bant 677CC yabanıl tipi, hem 198 bç hem de 175bç ve 23bç büyüklüğünde bantları içeren 677CT heterozigot tipi ve sadece 175bç ve 23bç büyüklüğünde bantları içeren de homozigot mutant genotipi ifade etmektedir.



Şekil 3.5 MTHFR PCR Ürünlerinin HinfI Enzimi ile Kesildikten Sonraki Jel Görüntüsü

Çalışılan toplam 208 olgu arasında %51'i (106) homozigot yabanıl (677CC), %40,9'u heterozigot (677CT) ve %8,1'i homozigot mutant (677 TT) olarak belirlenmiştir. Tüm kanserli olgular içinden %52,4'ü (54) homozigot yabanıl (677CC), %43,7'si (45) heterozigot ve % 3,9'u (4) homozigot mutant olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu örnekleri arasından %49,5'i (52) homozigot yabanıl, % %38'i (40) heterozigot ve %12,4'ü (13) homozigot mutant olarak belirlenmiştir.

Kanserli olgular arasından; mide kanserli olgulardan %55,2'si (16) homozigot normal ve %44,8'i (13) heterozigot olarak tanımlanmıştır. Çalışılan 29 mide kanserli olgu arasında homozigot yabanıl bireye rastlanmamıştır. Kolorektal kanserli olgulardan %52,6'sı (20) homozigot yabanıl, %39,5'i (15) heterozigot ve % 8,9'u (3) homozigot mutant olarak tanımlanmıştır. Pankreas kanserli olgular arasında %66,7'si (10) homozigot yabanıl ve %33,3'ü (5) heterozigot olarak tanımlanmış ve

Çalışılan pankreas kanserli olgular arasında homozigot yabancı tipe rastlanmamıştır. Karaciğer kanserli olgular arasında %38,1'i (8) homozigot yabancı, %38'i (40) heterozigot ve %12,4'ü homozigot mutant olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.8 MTHFR 677C\T Polimorfizminin Kanserli Olgular ve Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması

Gruplar	677CC (Homozigot Normal)						677CT (Heterozigot)						677TT (Homozigot Mutant)						Toplam
	Sayı	%	Bayan	%	Erkek	%	Sayı	%	Bayan	%	Erkek	%	Sayı	%	Bayan	%	Erkek	%	
<b>Mide Kanseri</b>	16	55,2	4	25	12	75	13	44,8	5	38,7	8	61,3	-	-	-	-	-	-	29
<b>Kolorektal Kanser</b>	20	52,6	6	30	14	70	15	39,5	6	40	9	60	3	8,9	1	33,3	2	66,7	38
<b>Pankreas Kanseri</b>	10	66,7	6	60	4	40	5	33,3	2	40	3	60	-	-	-	-	-	-	15
<b>Karaciğer Kanseri</b>	8	38,1	1	12,5	7	87,5	12	57,1	4	33,3	8	66,7	1	4,8	-	-	1	100	21
<b>GİS Kanserli Toplam</b>	54	52,4	17	31,5	37	68,5	45	43,7	17	37,8	28	62,2	4	3,9	1	25	3	75	103
<b>Kontrol</b>	52	49,5	15	28,8	37	72,2	40	38	29	72,5	11	27,5	13	12,4	7	53,8	8	46,2	105
<b>Toplam</b>	106	51	32	30,2	74	69,8	85	40,9	46	54,1	39	45,9	17	8,1	8	47	11	53	208

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve çevre doku ve organlara yayılması ile karakterize edilen bir hastalık grubudur. Eğer yayılma kontrol edilmezse ölümler sonuçlanır [49].

Gastrointestinal kanserler dünya çapında en sık rastlanan kanser tiplerindedir. Bu kanserlerin insidansı belirgin şekilde çeşitlilik gösterir. Birleşmiş Milletler, Avrupa, Avustralya ve Japonya'da kolorektal kanser en yüksek sıklığı gösterirken, Asya ve Afrika'da mide ve karaciğer kanseri sıklığı daha fazladır. Çevresel ve kalıtsal faktörler bu tümörlerin etiyolojisine katkıda bulunur. Bunun yanında sigara, hayat tarzı örneğin enfeksiyona açık olma, alkol alınımı, fiziksel aktivite ve diyet bu tip kanserlerin oluşumunda önemli rol oynar [106].

İnsan kanserlerinde karsinogenez mekanizması oldukça karmaşık ve çok faktörlüdür [46,107]. Bu faktörlerden olan nokta mutasyonları, kromozom translokasyonları ve gen amplifikasyonları sonucu kanser oluşumuna neden olan onkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu meydana gelebilmektedir [38].

Düşük penetranslı genlerdeki allelik değişiklikler geniş bireyler arası farklılıkların kanser arttırıcı ve kanser geliştirici bileşiklere hassasiyetine sebep olarak gösterilebilir. Bu genlerden birini varyant olarak taşıyan bir bireyin kanser riski düşük olarak tahmin edilir fakat bu genin bir populasyondaki yüksek frekansı riski arttırabilir [108].

1998 yılında Goyette ve arkadaşları tarafından floresan in situ hibridizasyon yöntemi ile metilen tetra hidrofolat redüktaz (MTHFR) geninin lokalizasyonunu 1.

Kromozomun p kolunun 36.3. bandı (1p36.3) olarak belirlenmiştir [109]. MTHFR 5,10-metilen tetrahidrofolatı, homosisteinin metionine remetilasyonu için substrat olan 5-metiltetrahidrofolata çevirir [67,75]. MTHFR folat metabolizmasında anahtar enzim rolündedir [16]. İnsanda MTHFR geni 11 ekzondan oluşur [8,9].

1995 yılında MTHFR geni 677. pozisyon, proteinin 222. kodonunda alanin-valin yer değiştirmesi ile sonuçlanan bir baz değişimi (C-T) tanımlanmıştır. Bu değişim protein termolabilitesinde artma ve enzim aktivitesinde bir azalmaya sebep olmaktadır. [9,11,70]. Homozigot mutant bireyler %30, heterozigot bireyler %60 enzim aktivitesine sahiptir [107]. Homozigot mutant genotip (677TT) düşük serum folatı, yüksek plazma homosisteini, kronik koroner hastalıklar, Down sendromu, Alzheimer ve bir çok kanser tipi ile bağlantılı bulunmuştur [9,11,70]. MTHFR genetik polimorfizmleri son on yılda kanser riski ile bağlantılı potansiyel genetik olarak artan bir ilgi görmektedir [107]. Birçok çalışmada MTHFR 677TT genotipi ile özofagus kanseri, mide kanseri ve pankreas kanseri arasında azalmış risk ilişkisi bulunmaktadır [110]. Buna karşın diğer bir çalışmada mide kanseri ile MTHFR polimorfizmi arasında bir bağlantı gözlemlenmemiştir [70].

MTHFR ve gastrointestinal kanserler arasında farklı araştırmacılar tarafından ileri sürülen bu bulguların, kesinleştirilmesi ve Türk populasyonunda MTHFR mutasyon oranının doğrulanması ve farklı gastrointestinal sistem kanser tiplerinde araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 5. Genel Cerrahi Kliniği Ünitesi ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Kliniği Ünitesi'nden 38'i mide, 29'u kolorektal, 15'i pankreas ve 21'i karaciğer olmak üzere toplam 103 GİS kanserli bunun yanında 105 kontrol grubu olmak üzere toplam 208 kan örneği çalışılmıştır. Çalışmamızda yer alan bireylerden alınan periferik kandan izole edilen DNA, PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. MTHFR 4. ekzon bölgesi uygun primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. Çalışmamızda MTHFR geni için daha önceden

tanımlanmış 677bç bölgesine ait polimorfizmlerin tespiti amacıyla RFLP yöntemi kullanılmıştır. Literatür taramaları sonucu HinfI enziminin MTHFR 677 bç bölgesi için spesifik bir bölge oluşturduğu (GANTC) tespit edilmiş ve çalışmamızda RFLP için HinfI enzimi kullanılmıştır.

Çalışmamızda MTHFR geni için RFLP analizi yapılan toplam 208 örnek içinde %51'i homozigot yabanıl, %40'9'u heterozigot ve %8,1'i homozigot mutant olarak tanımlanmıştır. Bu örneklerden 103'ünü kanserli olgu ve 105'ini kontrol grubu oluşturmaktadır. Çalışmamızda kontrol grubu, kanserli vakalar ile karşılaştırıldığında MTHFR 677TT homozigot varyant oranı üç kat artmış olarak bulunmaktadır (Çizelge 3.8). Kanserli olgular ve kontrol grubu karşılaştırıldığında homozigot yabanıl ve heterozigot bireylerin sayısı yaklaşık olarak aynıdır. Ayrıca cinsiyet ile mutasyon sıklığına baktığımızda kontrol grubunda bayanlar en fazla heterozigot genotipi göstermiştir (29 birey) ve erkeklere göre heterozigotluk yaklaşık üç kat fazladır. Tüm GIS kanserlerinde ise, homozigot yabanıl ve heterozigot bireylerde toplam erkek sayısı bayan sayısından yaklaşık iki kat fazladır.

Mutant bireyler incelendiğinde, kanserli hastalarda mutant bireylerin yüzdesi düşüktür. Hatta mide ve pankreas kanserinde 677TT polimorfizmine hiç rastlanmamıştır. Kolorektal ve karaciğer kanserlerinde mutant bireylerin frekansı düşmüştür. Aynı bulguya diğer bir araştırma grubunda ulaşmıştır, Q. Jiang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 677TT genotipli bireylerin düşük kolorektal kanser riski taşıdığı belirtilmiştir. DNA metilasyon durumu, düşük plazma folat seviyesi halinde genotip tarafından etkilenebilir. MTHFR genetik polimorfizmi ve kolorektal kanser yatkınlığı arasındaki bağlantının folat tüketimi ile düzenlenebileceği düşünülmektedir. B<sub>6</sub> ve B<sub>12</sub> vitamini ve folat alınımı yeterli olduğunda MTHFR 677 mutant bireyler %30-40 oranında azalmış kanser riskine sahip olabilirler [67,80]. Diğer bir çalışmada ise kolorektal kanser riski ile MTHFR genotipi arasında genel bir bağlantı olmadığı ancak T allelinin kolon kanserinde artmış, rektum kanserinde ise azalan risk oluşturabileceği belirtilmiştir [81].

Fosfatidilinositol-3-kinazlar çeşitli hücre sel siny al im yollar ı, hücre ço ğ al ma sı, fark lıla ş ma, gö ç, hücre sel trafik ve glukoz homeostasisini de içeren bir ço k hücre sel faaliyette görev alan lipid kinaz ailesidir [111]. PIK3CA fosfatidil inositol kinaz ın katalitik alt birimini kodlayan gen dir. Karşı la ş tır malı genomik hibridizasyon yöntemi ile 3. Kromozomun q kolunun 26.3. band ında bulundu ğ u tespit edilmi ş tir. Gen 34kb büyüklü ğ undedir [14,16,94].

Son dönemlerdeki çalı ş malar da PIK3CA genindeki yüksek sıklıkta ki mutasyon lar ı kolon, beyin, meme ve mide gibi bir ço k kanser tipinde tanımlanmı ş tir. PIK3CA'daki bu genetik de ğ i ş iklikler ekzon 9 ve 20 kodlanan dizilerinde meydana gelen somatik yanlış anlamlı mutasyon lar dır [16,112]. Bu mutasyon lar la ilgili elde edilen gözlemler;

- (i) Bu mutasyon lar ekzon 9 (helikal domain) ve ekzon 20 (katalitik domain) içinde rastlantısal olmadan da ğ ılım göstermi ş lerdir,
- (ii) Mutasyon lar ın ço ğ u aynı bölgede de ğ ildir,
- (iii) Mutasyon lar seçilimli olarak evrimde korunmuş ve kritik fonksiyonel öneme sahip bölgelerde görülmektedir ve
- (iv) Mutasyon lar dan biri enzim aktivitesi arttırıcı özelli ğ e sahiptir [111].

Campell ve arkadaş lar ı meme, ovaryum, kolorektal kanser tiplerin primer tümörlerinden izole ettikleri DNA' lar dan PIK3CA'nın 20 ekzonunun dizi analizini yaptılar ve di ğ er çalı ş malar da belirlenen mutasyon lar ın yanında ekzon 6,7 ve 8'de yeni mutasyon lar tanımladılar [16].

Lee ve arkadaş lar ı 2004 yılında yaptıkları hepatoselü ler karsinom, akut lösemi, mide kanseri, meme ve akci ğ er kanserli 668 olgudan oluş an çalı ş mada PIK3CA ekzon 9 ve 20'de karaci ğ er kanserli olgularda %36 ve mide kanserli olgularda % 6,5 oranında mutasyon tespit ettiler [113].

Mori ve arkadaşları PIK3CA geninin sıcak nokta bölgesi olan mutasyonların en fazla görüldüğü noktadaki 20. ekzon bölgesini genişleterek 21 ekzon bölgesini araştırmıştır. Bu tez çalışması kapsamında PIK3CA onkogeni 21. ekzon bölgesinde bulunan mutasyonların tespit edilmesi ve bu mutasyonların gastrointestinal sistem kanserleri ile ilişkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 5. Genel Cerrahi Kliniği Ünitesi ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Kliniği Ünitesi'nden farklı kanserlere sahip (Çizelge 3.1) bireylerden 70 kanserli kan örneği çalışılmıştır. Çalışmamızda yer alan bireylerden alınan periferik kandan izole edilen DNA, PCR yöntemi ile PIK3CA'nın ekzon 21 bölgesi çoğaltılmıştır. PIK3CA mutasyon analizi için dizi analizi, yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin kullanılmasının nedeni, bu bölgenin tamamıyla taranmasının hedeflenmesidir. Yapılan dizi analizleri hem forward hemde reverse primerleri ile gerçekleştirilmiş ve bu dizilerin birbirini tamamlamasıyla kesin sonuca ulaşılmış, daha sonra biyoinformatik olarak orijinal PIK3CA bölgesi ile karşılaştırılmıştır. 70 kanserli kan örneğinin tamamında herhangi bir nükleotit mutasyonuna rastlanmamıştır. Bu çalışma bize gastrointestinal sistem kanserlerinde PIK3CA'nın 21 ekzon bölgesinde herhangi bir polimorfizm göstermemektedir.

Tüm kanserler arasında oldukça büyük yeri kapsayan GİS kanserlerinin, polimorfik nükleotid dizilerine sahip kanser genlerin saptanması gelecekte yapılması gerekenler arasındadır.

.

## EKLER

### EK-A: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'nun tez projesi hakkındaki kararı



T.C  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURULU  
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, GAZİ UNIVERSTY  
ANKARA-TÜRKİYE  
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI  
İLAÇ DIŞI KLİNİK ÇALIŞMALAR

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL ADI	"Tiroit kanserinde RET, Gastrointestinal kanser tiplerinde de BRAF, KRAS, PIK3CA, CDH1 ve P53 Gen Mutasyonlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Dizi Analizi ile Araştırılması"				
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI, / ADI	Prof.Dr.Leyla Açık				
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi / değişiklik No.su	Dili Türkçe			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 311	Tarih : 17 Eylül 2008				
	G.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı araştırma projesine ait dosya; amaç, gerekçe, yaklaşım, yöntemler ve aydınlatılmış onamın yeterliliği yönünden incelenmiş ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde Etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU, HELSİNKİ BELGESİ, BİYOETİK SÖZLEŞMESİ					
ÜYELER						
Ünvanı / Adı / Soyadı / Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof.Dr.Necla BUYAN BAŞKAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları - Nefroloji	G.Ü.T.F Çocuk Sağ.ve Hast.A.D.	K		E xx E	
Prof. Dr. Firdevs Aktaş ÜYE	Enfeksiyon	G.Ü.T.F Enfeksiyon Hast. A.D.	K		E H H	Katılmadı
Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D.	K		E xx E	
Prof.Dr.Fatma ATALAY ÜYE	Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon	G.Ü.T.F Fiziksel Tıp ve Reha.A.D.	K		E H H	
Prof.Dr.Çağatay ÇİFTER ÜYE	Genel Cerrahi	G.Ü.T.F Genel Cerrahi A.D	E		x H H	
Prof.Dr.Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya Ecz. Fak.	G.Ü.E.F (Ecz.Fak.) Farmasötik Kimya	K		E xx E	
Prof.Dr.Reha KURUOĞLU ÜYE	Nöroloji	G.Ü.T.F Nöroloji A.D.	E		x H X H	Katılmadı
Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp tarihi A.D.	K		E xx E	
Doç.Dr.Mehmet Ali Ergün ÜYE	Tıbbi Genetik	G.Ü.T.F Tıbbi Genetik A.D.	E		x H H	
Doç.Dr.Ayılar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D	K		E xx E	
Doç.Dr.Canan ULUOĞLU ÜYE	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D.	K		x H H	
Doç.Dr.Münci YAĞCI ÜYE	İç Hastalıkları - Hematoloji	G.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D.	E		E xx E	
Yrd.Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E		x H H	
Hukuk Müşaviri Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E		E xx E	

\* Araştırma ile İlişki

\*\* Toplantıda Bulunma

**EK-B:** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu Tarafından  
Onaylanmış Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

## ***GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ***

### **GENETİK MATERYAL ÜZERİNDE YAPILACAK ARAŞTIRMALAR BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

**Araştırma Projesinin Adı:** Tiroit kanserinde RET, Gastrointestinal Kanser Tiplerinde de BRAF, KRAS, PIK3CA, CDH1 ve P53 Gen Mutasyonlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Dizi Analizi ile Araştırılması

**Sorumlu Araştırmacının Adı:** Prof. Dr. Leyla AÇIK

**Diğer Araştırmacıların Adı:** Özge Özcan

**Destekleyici (varsa):** Destekleyici Yoktur. Laboratuarda araştırma için gereken makine, kimyasal, malzeme ve enzimler mevcuttur.

“Tiroit kanserinde RET, Gastrointestinal Kanser Tiplerinde de BRAF, KRAS, PIK3CA, CDH1 ve P53 Gen Mutasyonlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Dizi Analizi ile Araştırılması” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma, araştırma amacı ile yapılmaktadır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapıldığını, sizinle ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neler içerdiğini, olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlıklarını bilmeniz önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırın ve bu bilgileri ailenizle ve/veya doktorunuzla tartışın. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir.

#### **1. Genetik çalışmanın amacı ve dayanağı nelerdir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?**

*a. Neden özellikle bu kişi / hasta seçilmiştir?*

**EK-B (Devam):** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu Tarafından Onaylanmış Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

*Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni sizde kanser hastalığı tanısı konmasıdır. Katılımınız ile bu hastalığın nedenlerini ortaya çıkaracak bir araştırma gerçekleştirilecektir.*

*b. Çalışmanın önemi ve gerekliliği nelerdir?*

*Genler, DNA olarak isimlendirilen genetik materyalden oluşurlar. DNA hücrenin bir bölümüdür ve kalıtsal özelliklerin (göz rengi gibi) oluşmasından sorumludur."Farklı kanser tipleri ile ilişkilendirilen çeşitli genler bulunmuştur. Bu araştırma ile sizin DNA'nızı çalışmak ve genlerinizde herhangi bir anormallik olup olmadığını ya da bu soruna neden olabilecek yeni genler olup olmadığını bulmak istiyoruz.*

*c. Çalışmaya toplam kaç kişinin katılımı planlanmaktadır?*

*Çalışmaya toplam 200 kişinin katılımı planlanmaktadır*

**2. Bu genetik çalışmaya katılmalı mıyım?**

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar verirseniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Böyle bir karar vermeniz durumunda tıbbi bakımınız bu durumdan etkilenmeyecektir.

**3. Genetik araştırma nasıl yapılacaktır?**

*a. Hangi örnek (ler) alınacak ve nasıl alınacaktır ?*

**EK-B (Devam):** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu Tarafından Onaylanmış Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

*Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz, 10 ml kadar bir miktarda kolunuzdan kan alınacaktır. Genellikle bir tek örnekleme yeterlidir ancak bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir.*

*b. Örnekte neler araştırılacak?*

*Örneklerden DNA izole edilerek kansere sebep olan gen mutasyonları araştırılacaktır. Bu çalışma için kan örnekleri RBC lizis tamponu serilerinden geçirilir. Santrifüj serilerinden sonra, proteinler ve DNA dışındaki tüm moleküller uzaklaştırılır. Alkol serilerinden geçirilerek DNA'nın kümeleşmesi sağlanır. Alkol uzaklaştırıldıktan sonra DNA çözücü, TE tamponunda saklanacaktır. Daha sonra PCR işlemi yapılacak PAGE ve agaroz jelde ürünleri yürütülerek PCR'in başarılı olup olmadığına bakılacaktır. Daha sonra PCR ürünleri DNA dizi analizi yapılacaktır.*

*c. Örnekler nerede çalışılacak?*

*Toplanan kanlar ile Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji laboratuvarında çalışılacaktır.*

*(Toplanan kanda yeterli genetik materyal elde edilemediği durumda ya da farklı bir metod ile çalışılma gerekliliğinde toplanan kandan hücre çoğaltması yoluna gidilebilir. Bu işlem "hücre kültürü" olarak adlandırılır ve bu yolla hücreleriniz ölümsüz olarak çoğaltılabilir.)*

*d. Genetik örneğin gelecekte nasıl imha edilmesi planlanıyor?*

*Elde edilen DNA, DNaz enzimi ile parçalanarak, atılacaktır.*

**EK-B (Devam):** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu Tarafından Onaylanmış Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

**4. Tarafımdan alınan örnekler gelecekte de kullanılabilir mi?**

*(Bu bölümde katılımcıdan “Tabakalandırılmış olur” olarak isimlendirilen bir onay alınmalıdır. Aşağıda yazılı olan bölüm aynen korunarak katılımcının aşağıdaki 4 seçenekten birini işaretlemesi istenmelidir.)*

Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin iznimize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar isminiz (kimlik bilgileriniz) korunmak ya da yok edilmek kaydı ile saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

- 1-  Tarafımdan alınan kodlanmış\* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.
- 2-  Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- 3-  Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- 4-  Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

\*Kodlanmış örnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

**EK-B (Devam):** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu Tarafından Onaylanmış Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

**5. Çalışmanın riskleri nelerdir?**

- a. Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz ve kolda morarma olabilir. Düşük bir olasılık da olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması, veya enfeksiyon riski vardır.
- b. Yapılacak genetik teste bağlı oluşabilecek riskler: Yapılan testler sizin veya ailenizin bir ferдинin ileriki bir zamanda bu genetik hastalıktan etkilenebileceğini ortaya çıkarabilir. Bu bilginin kötüye kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizi psikolojik yönden de olumsuz etkileyebilir.

**6. Çalışmanın yararları nelerdir?**

*Çalışmadaki genler pek çok kanser türüne sebep olmaktadır. Bu çalışma sayesinde kanserleşmeye sebep olan mutant genin özellikleri araştırılarak, Türkiye'deki, bizim çalıştığımız hastalardaki polimorfizmin durumunu ortaya çıkaracaktır.*

**7. Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?**

Çalışma doktorunuz, araştırmada yer alan diğer araştırmacılar ve destekleyici (varsa, firma adını belirtiniz) kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Size ait bulgular üçüncü kişilere, onayınız dışında hiçbir şekilde açıklanmayacaktır. Çalışmanın sonunda, size ait tüm sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız olduğu gibi böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetme hakkınız da vardır. Lütfen aşağıdaki kutucuklardan size uygun olanı işaretleyiniz:

Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istiyorum

Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istemiyorum.

Kendinizle ilgili genetik bilgiyi öğrenmeyi seçmeniz durumunda size (varsa) sağaltım ile ilgili bilgiler ve genetik danışmanlık hizmeti verilecektir.

Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

*(Çalışma için eğer gerekiyorsa aşağıdaki standart durumlar açıklanmalıdır)*

- *Örnek: Kanınız genetik faktörler açısından test edilecek ve elde edilen bilgi sizin hakkınızda bize genetik bilgi verecektir. Genetik testler, bu araştırma ile ilgisi olmayan size ait çok özel başka bilgiler de verebilir. Böyle bir durumda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacak ve bilgiler üçüncü şahıslara sizin onayınız olmaksızın açıklanmayacaktır.)*

#### **8. Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir?**

a. *Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.*

#### **9. Çalışmanın ticari bir yönü var mıdır?**

Gönüllülerden elde edilen bilgilerden, tıbbi testler ya da tedaviler geliştirilebilmesi gibi ticari bir fayda sağlanabilir. Böyle bir durum olursa, gönüllüler herhangi bir şekilde ticari gelir temin etmeyeceklerdir.

#### **10. Göreceğim olası bir zarar durumunda ne yapılacak?**

- *Araştırmadan dolayı katılımcının göreceği olası bir zararda bunun sorumluluğunun ve giderilmesi için gerekli her türlü tıbbi müdahalenin yapılacağını; bu konudaki tüm harcamamaların üstlenileceğini belirtiriz.*

**EK-B (Devam):** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu Tarafından Onaylanmış Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

**11. Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim?**

Araştırma ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksinim duyduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Prof. Dr. Leyla AÇIK

GÖREVİ : Öğretim Üyesi

TELEFON : (312) 202 11 85

***(Katılımcının/Hastanın Beyanı)***

GÜFEF Biyoloji Anabilim dalında, Prof. Dr. Leyla AÇIK tarafından genetik bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağını bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi girişimin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi girişimlerle ilgili olarak parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr.....(Doktor ismi), .....(telefon ve adres) ‘ten arayabileceğimi biliyorum. (Doktor ismi, telefon ve adres bilgileri mutlaka belirtilmelidir)

**EK-B (Devam):** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu Tarafından Onaylanmış Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu genetik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

**Katılımcı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

**Görüşme tanığı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

**Katılımcı ile görüşen hekim**

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

**EK-C: Çalışılan Toplam 208 Olgunun Listesi**

Olgu No	Cinsiyet	Tanı
1	Erkek	Kolon Kanseri
2	Erkek	Mide Kanseri
3	Erkek	Pankreas Kanseri
4	Erkek	Mide Kanseri
5	Erkek	Mide Kanseri
6	Bayan	Mide Kanseri
7	Bayan	Mide Kanseri
8	Bayan	Mide Kanseri
9	Erkek	Pankreas Kanseri
10	Bayan	Mide Kanseri
11	Bayan	Kolorektal Kanser
12	Erkek	Mide Kanseri
13	Bayan	Mide Kanseri
14	Erkek	Karaciğer Kanseri
15	Erkek	Mide Kanseri
16	Erkek	Mide Kanseri
17	Bayan	Pankreas Kanseri
18	Bayan	Karaciğer Kanseri
19	Bayan	Kolorektal Kanser
20	Erkek	Kolorektal Kanser
21	Bayan	Pankreas Kanseri
22	Erkek	Mide Kanseri
23	Erkek	Mide Kanseri
24	Erkek	Kolorektal Kanser
25	Bayan	Kolorektal Kanser
26	Erkek	Karaciğer Kanseri
27	Bayan	Kolorektal Kanser
28	Erkek	Mide Kanseri
29	Erkek	Karaciğer Kanseri
30	Erkek	Karaciğer Kanseri
31	Erkek	Karaciğer Kanseri
32	Erkek	Pankreas Kanseri
33	Erkek	Kolorektal Kanser
34	Erkek	Kolorektal Kanser
35	Erkek	Mide Kanseri
36	Bayan	Kolorektal Kanser
37	Erkek	Pankreas Kanseri
38	Bayan	Mide Kanseri
39	Bayan	Mide Kanseri
40	Bayan	Kolorektal Kanser
41	Bayan	Karaciğer Kanseri
42	Erkek	Kolorektal Kanser
43	Erkek	Kolorektal Kanser

**EK-C (Devam):** Çalışılan Kanserli ve Kontrol Grubu Olmak Üzere Toplam 208 Olgunun Listesi

Olgü	Cinsiyet	Tanı
44	Erkek	Mide Kanseri
45	Bayan	Rektum
46	Bayan	Mide Kanseri
47	Erkek	Pankreas Kanseri
48	Erkek	Mide Kanseri
49	Erkek	Karaciğer Kanseri
50	Bayan	Mide Kanseri
51	Erkek	Kolorektal Kanseri
52	Erkek	Karaciğer Kanseri
53	Erkek	Karaciğer Kanseri
54	Erkek	Karaciğer Kanseri
55	Bayan	Karaciğer Kanseri
56	Erkek	Mide Kanseri
57	Bayan	Kolorektal Kanseri
58	Erkek	Karaciğer Kanseri
59	Bayan	Pankreas Kanseri
60	Erkek	Karaciğer Kanseri
61	Erkek	Mide Kanseri
62	Erkek	Mide Kanseri
63	Erkek	Kolorektal Kanseri
64	Erkek	Mide Kanseri
65	Erkek	Mide Kanseri
66	Bayan	Kolorektal Kanseri
67	Erkek	Kolorektal Kanseri
68	Bayan	Pankreas Kanseri
69	Erkek	Kolorektal Kanseri
70	Bayan	Pankreas Kanseri
71	Bayan	Karaciğer Kanseri
72	Erkek	Kolorektal Kanseri
73	Erkek	Kolorektal Kanseri
74	Erkek	Mide Kanseri
75	Erkek	Kolorektal Kanseri
76	Erkek	Karaciğer Kanseri
77	Bayan	Kolorektal Kanseri
78	Erkek	Karaciğer Kanseri
79	Bayan	Kolorektal Kanseri
80	Bayan	Pankreas Kanseri
81	Bayan	Pankreas Kanseri
82	Erkek	Mide Kanseri
83	Erkek	Kolorektal Kanseri

**EK-C (Devam):** Çalışılan Kanserli ve Kontrol Grubu Olmak Üzere Toplam 208 Olgunun Listesi

Olgu	Cinsiyet	Tanı
84	Erkek	Kolorektal Kanser
85	Erkek	Kolorektal Kanser
86	Erkek	Karaciğer Kanseri
87	Erkek	Kolorektal Kanser
88	Erkek	Kolorektal Kanser
89	Erkek	Kolorektal Kanser
90	Erkek	Mide Kanseri
91	Erkek	Pankreas Kanseri
92	Erkek	Kolorektal Kanser
93	Erkek	Pankreas Kanseri
94	Erkek	Kolorektal Kanser
95	Bayan	Kolorektal Kanser
96	Erkek	Kolorektal Kanser
97	Erkek	Karaciğer Kanseri
98	Bayan	Pankreas Kanseri
99	Erkek	Karaciğer Kanseri
100	Bayan	Karaciğer Kanseri
101	Erkek	Kolorektal Kanser
102	Erkek	Kolorektal Kanser
103	Bayan	Kolorektal Kanser
104	Bayan	Kontrol Grubu
105	Bayan	Kontrol Grubu
106	Bayan	Kontrol Grubu
107	Erkek	Kontrol Grubu
108	Bayan	Kontrol Grubu
109	Bayan	Kontrol Grubu
110	Bayan	Kontrol Grubu
111	Erkek	Kontrol Grubu
112	Erkek	Kontrol Grubu
113	Bayan	Kontrol Grubu
114	Bayan	Kontrol Grubu
115	Bayan	Kontrol Grubu
116	Bayan	Kontrol Grubu
117	Bayan	Kontrol Grubu
118	Bayan	Kontrol Grubu
119	Bayan	Kontrol Grubu
120	Bayan	Kontrol Grubu
121	Erkek	Kontrol Grubu
122	Bayan	Kontrol Grubu
123	Bayan	Kontrol Grubu
124	Bayan	Kontrol Grubu
125	Erkek	Kontrol Grubu

**EK-C (Devam):** Çalışılan Kanserli ve Kontrol Grubu Olmak Üzere Toplam 208 Olgunun Listesi

Olgu	Cinsiyet	Tanı
126	Bayan	Kontrol Grubu
127	Erkek	Kontrol Grubu
128	Erkek	Kontrol Grubu
129	Erkek	Kontrol Grubu
130	Bayan	Kontrol Grubu
131	Bayan	Kontrol Grubu
132	Erkek	Kontrol Grubu
133	Bayan	Kontrol Grubu
134	Bayan	Kontrol Grubu
135	Bayan	Kontrol Grubu
136	Bayan	Kontrol Grubu
137	Bayan	Kontrol Grubu
138	Bayan	Kontrol Grubu
139	Erkek	Kontrol Grubu
140	Erkek	Kontrol Grubu
141	Bayan	Kontrol Grubu
142	Bayan	Kontrol Grubu
143	Bayan	Kontrol Grubu
144	Bayan	Kontrol Grubu
145	Erkek	Kontrol Grubu
146	Erkek	Kontrol Grubu
147	Erkek	Kontrol Grubu
148	Bayan	Kontrol Grubu
149	Bayan	Kontrol Grubu
150	Bayan	Kontrol Grubu
151	Bayan	Kontrol Grubu
152	Bayan	Kontrol Grubu
153	Bayan	Kontrol Grubu
154	Bayan	Kontrol Grubu
155	Bayan	Kontrol Grubu
156	Erkek	Kontrol Grubu
157	Bayan	Kontrol Grubu
158	Bayan	Kontrol Grubu
159	Bayan	Kontrol Grubu
160	Bayan	Kontrol Grubu
161	Bayan	Kontrol Grubu
162	Bayan	Kontrol Grubu
163	Erkek	Kontrol Grubu
164	Bayan	Kontrol Grubu
165	Bayan	Kontrol Grubu

**EK-C (Devam):** Çalışılan Kanserli ve Kontrol Grubu Olmak Üzere Toplam 208 Olgunun Listesi

Olgu	Cinsiyet	Tanı
166	Bayan	Kontrol Grubu
167	Erkek	Kontrol Grubu
168	Erkek	Kontrol Grubu
169	Bayan	Kontrol Grubu
170	Bayan	Kontrol Grubu
171	Bayan	Kontrol Grubu
172	Erkek	Kontrol Grubu
173	Bayan	Kontrol Grubu
174	Erkek	Kontrol Grubu
175	Bayan	Kontrol Grubu
176	Bayan	Kontrol Grubu
177	Erkek	Kontrol Grubu
178	Bayan	Kontrol Grubu
179	Erkek	Kontrol Grubu
180	Bayan	Kontrol Grubu
181	Bayan	Kontrol Grubu
182	Bayan	Kontrol Grubu
183	Bayan	Kontrol Grubu
184	Bayan	Kontrol Grubu
185	Erkek	Kontrol Grubu
186	Erkek	Kontrol Grubu
187	Bayan	Kontrol Grubu
188	Bayan	Kontrol Grubu
189	Erkek	Kontrol Grubu
190	Erkek	Kontrol Grubu
191	Bayan	Kontrol Grubu
192	Erkek	Kontrol Grubu
193	Bayan	Kontrol Grubu
194	Bayan	Kontrol Grubu
195	Bayan	Kontrol Grubu
196	Erkek	Kontrol Grubu
197	Bayan	Kontrol Grubu
198	Bayan	Kontrol Grubu
199	Erkek	Kontrol Grubu
200	Erkek	Kontrol Grubu
201	Bayan	Kontrol Grubu
202	Bayan	Kontrol Grubu
203	Erkek	Kontrol Grubu
204	Bayan	Kontrol Grubu
205	Bayan	Kontrol Grubu
206	Bayan	Kontrol Grubu
207	Erkek	Kontrol Grubu

**EK-C (Devam):** Çalışılan Kanserli ve Kontrol Grubu Olmak Üzere Toplam 208 Olgunun Listesi

Olgu	Cinsiyet	Tanı
208	Bayan	Kontrol Grubu

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Garrett M., “Cell Cycle Control and Cancer”, *Current Science*, (2001) **81**, (5).
- [2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P., “Global Cancer Statistics, 2002”, *CA Cancer J Clin*, (2005), **55**, (2), 74-108.
- [3] İzmirli M., Altın S., Dernek B. O., Ünsal M., “SSK Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Onkoloji Merkezi'nin 1999-2004 Yılları Kanser İstatistikleri”, *Türk Onkoloji Dergisi* (2007), **22**, (4), 172-182.
- [4] Öztürk A. Meme Kanseri Olgularının Lenfosit Hücrelerinde Kardeş Kromatid Değişim Sıklığı., Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya, (1995).
- [5] Ökten A., Gastroenterohepatoloji İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi. Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları, Nobel Tıp Kitabevleri, (2001).
- [6] Memik F., Mide Hastasının El Kitabı, Ülser, Gastrit, Kanser Sebepleri, Tanı ve Tedavi, Nobel&Güneş Tıp Kitabevi, Bursa, (2008).
- [7] Sharp L, Little J., “Polymorphism in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review”, *Am J Epidemiol*, (2004), **159**, 423-443.

- [8] Gayette P, Par A, Milas R, Frasst P, Tran P, “Gene Structure of Human and Mouse Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR)”, *Mammalian Genome*, (1998), **9**, 652-656.
- [9] Langevin S. M., Lin D., Matsuo K., Gao C. M., Takezaki T., Stolzenberg-Solomon R.Z., Vasavi M., Hasan Q., Taioli E., “Review and Pooled Analysis of Studies on MTHFR C677T Polymorphism and Esophageal Cancer”, *Toxicology Letters*, (2009), **184**, (2), 73-80.
- [10] Martinez C. V., The Effect of the Interaction Folate – MTHFR 677 C>T Mutation on DNA Integrity and Gene Expression, Ph. Doctora Thesis, Friedman School of Nutrition Science and Policy, Tufts University, (2006).
- [11] [Leopardi P., Marcon F., Caiola S., Cafolla A., Siniscalchi E., Zijno A., Crebelli R., “Effects of Folic Acid Deficiency and MTHFR C677T Polymorphism on Spontaneous and Radiation-Induced Micronuclei in Human Lymphocytes”, *Mutagenesis* , (2006), **21**, (5), p327–333.
- [12] Stuppia L., Gatta A. R., Antonucci I., Morizio E., Calabrese G., Palka G., “C677T Mutation in the 5,10-MTHFR Gene and Risk of Down Syndrome in Italy”, *European Journal of Human Genetics* (2002), **10**, 388 – 390.
- [13] Ikenoue T., Kanai F., Hikiba Y., Obata T., Tanaka Y., Imamura J., Ohta M., Jazag A., Guleng B., Tateishi K., Asaoka Y., Matsumura M., Kawabe T., Omata M., “Functional Analysis of PIK3CA Gene Mutations in Human Colorectal Cancer”, *Cancer Res* ,(2005), **65**, (11), 4562.

- [14] Liu Z., Roberts T. M., “Human Tumor Mutants in the p110alpha Subunit of PI3K”, *Cell cycle*, (2006), **5**, (7).
- [15] Ma Y. Y., Wei S. J., Lin Y. C., Lin Y. C., Lung J. C., Chang T. C., Wang-Peng J., Liu M. J., Yang D. M., Yang W. K., Shen C. Y., “PIK3CA as an Oncogene in Cervical Cancer”, *Oncogene*, (2000) **19**, 2739.
- [16] Karaks B., Bachman K. E., Park B. H., “Mutation of the PIK3CA Oncogene in Human Cancers”, *British Journal of Cancer* (2006) **94**, 455–459.
- [17] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/54792081> (25.07.09).
- [18] Ruddon R.W., *Cancer Biology*, Fourth Edition, Oxford University Press, (2007),12.
- [19] Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., Thompson&Thompson *Tıbbi Genetik*, 6.Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, (2005), p.11.
- [20] Şengelen M, *Türkiye'de Kanser İstatistikleri*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kanser Epidemiyolojisi, Ankara, (2002).
- [21] American Cancer Society, “Cancer Facts & Figures 2008”, Atlanta, American Society, (2008).

- [22] Schulz W A., Molecular Biology of Human Cancers, Springer ,(2005).
- [23] Russel P. J., IGenetics: A Molecular Approach, Second Ed., Pearson, (2006), p.606.
- [24] Klug W. S., Cummings M. R., Genetik Kavramlar, Öner C., Palme Yayıncılık, Ankara, (2003), p.28, 635,643.
- [25] Ekmekçi A., Gen, Genetik Değişim ve Hastalıklar, Gazi Kitabevi, (2006), p.217-224.
- [26] Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L., “Genetic disorders: In Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L., eds. Robbins pathologic basis of disease” W.B. Saunders Company: Philadelphia, (1989), 121-162.
- [27] Arı B., P53 Yolağında Yer Alan MDM2 ve p53 Genlerinde Görülen Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Meme Kanserli Hastalarda Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, (2008).
- [28] Alberts B., Watson J. D., Molecular Biology of The Cell, Third Ed., Garland Publishing, (1999), 1603.
- [29] Lodish H., Berk A., Molecular Cell Biology, Fifth Ed., WH Freeman, p.17,887,957.

- [30] Heuvel S., “Cell Cycle Regulation”, *WormBook, ed.*, (2005).
- [31] Klug W., Cummings M. R., *Concept of Genetics*, 8 ed, Prentice Hall, (2005).
- [32] Güneş H. V., *Moleküler Hücre Biyolojisi*, Kaan Kitabevi, Eskişehir, (2003).
- [33] Verneulen K., Bockstaele V., “The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer”, *Cell Prolif.*, (2003), **36**, 131–149.
- [34] Cabadak H., “Hücre Siklusu ve Kanser”, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, (2008), **9**, (3), 51-61 .
- [35] Foster I., “Cancer: A Cell Cycle Defect”, *Radiography*, (2008), **14**, 144.
- [36] Vermeulen K., Berneman Z., Bockstaele V., “Cell Cycle and Apoptosis”, *Cell Prolif.*, (2003), **36**, 165–175.
- [37] Turner P. C., McLennan A. G., Bates A.D., White M. R. H., *Moleküler Biyoloji: Önemli Notlar*, 2. Baskıdan Çeviri, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, (2004), p.302, 462.

- [38] Demirelli F. H., “Kanserin Moleküler Genetik Temelleri”, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Güncel Klinik Onkoloji Sempozyum Dizisi, (2003), **37**, 9.
- [39] Lewin B., Gene VIII, Pearson, United States of America, (2004),p.812-845.
- [40] Karahan N., Kolorektal Karsinomlarda p53 Gen Ekspresyonunun Klinik ve Histopatolojik Parametreler İle İlişkisi, Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Isparta, (2001).
- [41] Haupt S., Berger M., Goldberg Z., Haupt Y., “Apoptosis- P53 Network”, *Journal of Cell Science*, (2003), **116**, 4077-4085.
- [42] Nelson D. L., Cox M. M., Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Ed., W.H. Freeman, (2004), p470-473.
- [43] Bolsover S., Hyams J., Shephard E. A., White H. A., Wiedeman C., Cell Biology: A Short Course, Second Ed., Wiley-Liss, Canada, (2004), p415.
- [44] Kapan M., “Mide Kanseri: Tanı ve Cerrahi Tedavi” , İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu, (2001), 253.

- [45] Tuncer İ., Uygan İ., Kösem M., Özen S., Uğraş S., Türkdoğan K., “Van ve Çevresinde Görülen Üst Gastrointestinal Sistem Kanserlerinin Demografik ve Histopatolojik Özellikleri” Van Tıp Dergisi, (2001), **8**, (1), 10.
- [46] Snidler J.L., Helicobacter pylori stimulates gastric cancer cell motility through a combination of caga dependent and caga independent signaling, Ph.D. Thesis, Brigham Young University, (2008).
- [47] Chan W.Y., Infectious agents and gastric cancers, Ph.D. Thesis, The Chinese University of Hong Kong, (2000).
- [48] Okur K., Çetin R., Çetin M., Bülbül M., “Gastrointestinal Sistem Malignitelerinde Preoperatif Radyolojik Görüntülemenin Rolü”, SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, (2000), **7**, (2), 69.
- [49] American Cancer Society, “Cancer Facts & Figures 2007”, Atlanta, American Society, (2007).
- [50] Ajani J.A., Curley S.A. Lynch P.M., Janjan N., Gastrointestinal Cancer, Springer, (2005).
- [51] Karahasanoğlu T., “Kolonorektal Kanserler: Tanı ve Cerrahi Tedavi”, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu Dizisi, İstanbul, (2001), 271.

- [52] Shelton AA, Wong WD., “Colorectal cancer: In Current Surgical Therapy”., Cameron SL. St Louis, Mosby, (1999), 217.
- [53] Durhan E., Kolon Kanseri Tanılı Olgularda PCR-RFLP Metodu ile P53 Gen Mutasyonlarının Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon, (2006).
- [54] Göral V., “Kolorektal Polipler ve Polipozis Sendromları”, *Güncel Gastroenteroloji*, (2003), 7, (1), 32 .
- [55] Kievit J., “Follow-up of Patients with Colorectal Cancer: Numbers Needed to Test and Treat”, *European Journal of Cancer*, (2002), 38, 986–999.
- [56] Çakar E.Ş., Genom Metilasyon Profilinin Kolorektal Kansere Etiyolojisindeki Rolü, Uzmanlık Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Sivas, (2007).
- [57] Şimşek A., “Rektum Kanserlerinde Preoperatif Evrelemenin Cerrahi Yöntem Seçimine ve Postoperatif Yaşam Süresine Etkisi”, Uzmanlık Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Gastroenterolojik Cerrahi Bilim Dalı, Ankara (1995).
- [58] Göksoy E., Kapan M., “Karaciğerin Primer Habis Tümörleri” İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu Dizisi, (2002), 28, 159.

- [59] <http://www.kanseroji.com/category/karaciger-kanseri> (25.07.09).
- [60] Büyükunal E., “Karaciğer Kanseri Tedavisinde Medikal Onkolojik Yaklaşım” İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Hepatobilier ve Pankreas Hastalıkları Sempozyumu Dizisi, (2002), **28**, 191.
- [61] Göksoy E., Kapan M., “Karaciğerin Metastatik Tümörleri”, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu Dizisi, (2002), **28**, 183.
- [62] Çökmez A., Pankreas Kanseri: Patogenez, Tanı ve Tedavi, Güven&Nobel Kitabevleri, (1999).
- [63] Vimalachandran D., Ghaneh P., Costello E., Neoptolemos J., “Genetics and Prevention of Pancreatic Cancer” , *Cancer Control*, (2004), **11**, (1).
- [64] <http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/mthfr.jpeg> (25.07.09).
- [65] Shelnut K. P., Kauwell G. P. A., , Gregory J. F., Maneval D. R. , Quinlivan E. P., Theriaque D. W., George N. Henderson G. N., Bailey L. B., “Effect of the Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism on Polate Status and DNA Methylation Response in Young Woman”, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **15**, (9), (2004), p554-560.
- [66] Taşçıoğlu N., Gastrointestinal Sistem Kanselerinde Metilentetrahidrofolat Redüktaz Geni 677 C→T, 1298 A → C ve Metiyonin

Sentetaz Geni 2756 A→G Polimorfizmlerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, (2005).

- [67] Slattery M. L., Potter J. D., Samowitz W., Schaffer D., Leppert M., “Methylenetetrahydrofolate Reductase, Diet, and Risk of Colon Cancer”, *Cancer Epidemiology*, (1999), **8**, 513-518.
- [68] Jencks D. A., Mathews R. G., “Allosteric Inhibition of Methylenetetrahydrofolate reductase by Adenosylmethionine. Effects of adenosylmethionine and NADPH on the Equilibrium Between Active and Inactive Forms of the Enzyme and on the Kinetics of Approach to Equilibrium” *Biol. Chem.*, (1987), **262**, (6), 2485–93.
- [69] Rosenblatt D. S., “Clinically Imported Genes: Methylenetetrahydrofolate Reductase”, *Clin Invest Med*, (2001), **24**, (1), 56-9.
- [70] Götze T., Röcken C., Röhl F., Wex T., Hofmann J., Westphal S., Maltferheiner P., Ebert M., Dierkes J., “Gene Polymorphisms of Folate Metabolizing Enzymes and the Risk of Gastric Cancer”, *Cancer Letters*, (2007), **251**, 228–236.
- [71] Giovannucci E., “Epidemiologic Studies of Folate and Colorectal Neoplasia: A Review.”, *J. Nutr.*, (2002), **132**, (8), 2350S–2355.

- [72] Le Marchand,L., Wilkens,L.R., Kolonel, L.N., Henderson,B.E., “The MTHFR C677T Polymorphism and Colorectal Cancer: The Multiethnic Cohort Study”, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, (2005), **14**, 1198–1203.
- [73] Boccia S., Boffetta P., Brennan P., Ricciardi G., Gianfagna F., Matsuo K., Duijn C., Hung R., “Meta-analyses of The Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms and Risk of Head and Neck and Lung Cancer”, *Cancer Letters* , (2009), **273**, 55–61.
- [74] Boris M., Goldblatt A, Galanko J, James J., “Association of MTHFR Gene Variants with Autism”, *Journal of American Physicians and Surgeons*, (2004), **9**, (4) .
- [75] Skibola C., Smith M., Kane E., Roma Ne., Rollinson S., Cartwright A. R., Morgan G., “Polymorphisms in The Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene are Associated with Susceptibility to Acute Leukemia in Adults”, *PNAS*, (1999), **96**, (22), 12810–12815.
- [76] Lucock M., Yates Z.,“Folic acid, B vitamin and panacea or genetic time bomb?”, *Nature Reviews Genetics*, (2006), **6**, 235-240.
- [77] Chen Z., Liu Y., Zhang D., Liu Z., Wang P., Zhou D., Zhao T., Wang T., Xu H., Li S., Feng G., He L., Yu L., “C677T Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms in Bipolar Disorder: An Association Study in the Chinese Population and A Meta-Analysis of Genetic Association Studies”, *Neuroscience Letters*, (2009), **449**, 48–51.

- [78] Sırmalı R., Koca Y., Erden G., Aydın Y., Berker D., Güler S., “Tip 2 Diyabetli Bireylerde MTHFR C677T ve A1298C Gen Polimorfizmleri ile Diyabetik Retinopati Arasındaki İlişkinin İncelenmesi”, *Türk Biyokimya Dergisi*, (2008), **33** , (2) , 71–76.
- [79] Bononi A., Gusella M., Stievano L., Ferrazzi E., Pasini F., “Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene Polymorphisms in Elderly Colorectal Cancer Patients Treated with Capecitabine”, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, (2008) , **68** , 42.
- [80] Jiang Q., Chen K., Ma X., Li Q., Yu W., Shu G., Yao K., “Diets, Polymorphisms of Methylenetetrahydrofolate Reductase, and the Susceptibility of Colon Cancer and Rectal Cancer”, *Cancer Detection and Prevention*, (2005), **29**, 146–154.
- [81] Kim D. H., Ahn Y. O., Lee B. H., Tsuji E., Kiyohara C., Kono S., “Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism, Alcohol Intake, and Risks of Colon and Rectal Cancers in Korea”, *Cancer Letters*, (2004), **216**, 199–205.
- [82] Wu X., Liang Z., Zou T., Wang X., “Effects of Folic Acid Deficiency and MTHFR C677T Polymorphisms on Cytotoxicity in Human Peripheral Blood Lymphocytes”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (2009).
- [83] Sharp L., Little J., “Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review”, *American Journal of Epidemiology*, (2004), **159**, (5), 423.

- [84] Vogt P., Kang S., Elsliger M. A., Gymnopoulos M., “Cancer – Specific Mutations in Phosphatidylinositol 3- Kinase”, *Trends in Biochemical Sciences*, (2007), **32**, (7), 343.
- [85] Zhao J., Liu Z., Wang L., Shin E., Loda M. F., Roberts T. M., “The Oncogenic Properties of Mutant p110 $\alpha$  and p110 $\beta$  Phosphatidylinositol 3-Kinases in Human Mammary Epithelial Cells”, *PNAS*, (2005) **102**, (51) , 18443–18448.
- [86] Gardefors K., “The Effects of PIK3CA Mutations on the Function and Structure of the Phosphatidylinositol 3-kinase p110 $\alpha$  Catalytic Subunit in Breast Cancer”, Project in Microbial Biotechnology, Department of Biomedicine and Surgery Division of Oncology Faculty of Health Sciences Linköpings Universitet, (2007).
- [87] Velho S., Oliveira C., Ferreira A., Ferreira A. C., Suriano G., Schwartz S., Duval A., Carneiro F., Machado J. S., Hamelin R., Seruca R., “The Prevalance of PIK3CA Mutations in Gastric and Colon Cancer”, *European Journal of Cancer*, (2005) , **41**, 1649–1654.
- [88] Doğan L, Güç D., “Sinyal İletimi Mekanizmaları ve Kanser”, *Hacettepe Tıp Dergisi*, (2004), **35**, 34-42.
- [89] Engelman J. A., Cantley J. L., “The Evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism”, *Nature Reviews Genetics*, (2006), **7**, 606-619.

- [90] [Zhao L., Vogt P. K., “Helical Domain and Kinase Domain Mutations in p110 of Phosphatidylinositol 3-kinase Induce Gain of Function by Different Mechanisms”, *PNAS*, (2008), **105**, (7), 2652–2657 .
- [91] Zhang H., Liu G., Dziubinski M., Yang Z., Ethier S. P., Wu G., “Comprehensive Analysis of Oncogenic Effects of PIK3CA Mutations in Human Mammary Epithelial Cells”, *Breast Cancer Res Treat*, (2007).
- [92] <http://www.genecards.org/pics/loc/GC03P180399.PIK3CA.png>  
(25.07.09).
- [93] Samuels Y., Wang Z., Bardelli A. , Silliman N., Ptak J., Szabo S., Yan H., Gazdar A., Powell M. S., Riggins G. J. , Willson J. K. V., Markowitz S. ,Kinzler K. V. , Vogelstein B. , Velculescu V. E., “High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers”, *Science*, (2004), **304**, 554.
- [94] Mori R., Ishiguro H., Kimura M., Mitsui A., Sasaki H., Tomoda K., Mori Y., Odawa R., Katada T., Kawano O., Harada K., Fujii Y., Kuwabara Y., “PIK3CA Mutation Status in Japanese Esophageal Squamous Cell Carcinoma”, *Journal of Surgical Research*, (2008), **145**, 320–326.
- [95] Whyte D. B, Holbeck S. L., “Correlation of PIK3Ca Mutations with Gene Expression and Drug Sensitivity in NCI-60 Cell Lines”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (2006), **340**, 469–475.

- [96] Yıldırım A., Bardakçı F., Karataş M., Tanyolaç T., Moleküler Biyoloji: Protein Sentezi ve Yıkımı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, (2007), p.300.
- [97] Nosho K., Kawasaki T., Ohnishi M., Suemoto Y., Kirkner G., Zepf D., Yan L., Longtine J., Fuchs C. S., Ogino S., “PIK3CA Mutation in Colorectal Cancer: Relationship with Genetic and Epigenetic Alterations”, *Neoplasia*, (2008), **10**, 534–541.
- [98] Birben E., “Polimeraz Zincir Reaksiyonu”, *Astım Allerji İmmünoloji*, (2006), **4**, (2), 92-94.
- [99] Temizkan G., Arda N., Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul , (2008).
- [100] <http://www.landcareresearch.co.nz/research/biocons/genetics/images/PCR9700.jpg> (25.07.09).
- [101] [http://www.mun.ca/biology/scarr/PCR\\_sketch\\_3.gif](http://www.mun.ca/biology/scarr/PCR_sketch_3.gif)(25.07.09).
- [102] [http://wpcontent.answers.com/wikipedia/commons/thumb/a/a6/Gel\\_electrophoresis\\_apparatus.JPG/288px-Gel\\_electrophoresis\\_apparatus.JPG](http://wpcontent.answers.com/wikipedia/commons/thumb/a/a6/Gel_electrophoresis_apparatus.JPG/288px-Gel_electrophoresis_apparatus.JPG) (25.07.09).
- [103] [http://www.biologyreference.com/images/biol\\_02\\_img0140.jpg](http://www.biologyreference.com/images/biol_02_img0140.jpg) (25.07.09).

- [104] Passarge E., Color Atlas of Genetics, 2nd Edition, Thieme Stuttgart, New York, (2001), p53.
- [105] [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/54792081?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence\\_ResultsPanel.Sequence\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/54792081?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum) (25.07.09).
- [106] Kelsen D. P., Principles and Practice of Gastrointestinal Oncology, Second Edition, Lipincott, Williams & Wilkins, (2001).
- [107] Reljic A., Simundic A. M., Topic E., Nikolac N., Justinic D., Stefanovic M., “The methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Polymorphism and Cancer Risk: The Croatian Case–Control Study”, *Clinical Biochemistry*, (2007), **40**, 981–985.
- [108] Jong M. M., Nolte I. M., Meerman G. J., Graaf W. T. A., Vries E. G. E., Sijmons R. H., Hofstra R. M. W., Kleibeuker J. H., “Low-penetrance Genes and Their Involvement in Colorectal Cancer Susceptibility”, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, (2002), **11**, 1332–1352.
- [109] Frosst P., Blom H. J., Milos R., Goyette P., Sheppard C. A., Matthews R. G., Boers G. J. H., Heijer M., Kluijtmans L. A. J., Heuvel L. P., Rozen R., “A Candidate Risk Factor for Vascular Disease: A Common Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductase”, *Nature Genetics*, (1995), **10**, 111.

- [110] Larsson S. C., Giovannucci E., Wolk A., “Folate Intake, MTHFR Polymorphisms, and Risk of Esophageal, Gastric, and Pancreatic Cancer: A Meta-analysis”, *Gastroenterology*, (2006), **131**, (4), 1271-1283.
- [111] Gallia G. L., Rand V., Siu M., Eberhart C. G., James C. D., Marie S. K. N., Oba-Shinjo S. M., Carlotti C. G., Caballero O. G., Simpson A. J. G., Brock M., Massion P. P., Carson B. S., Riggins G. J., “PIK3CA gene Mutations in pediatric and Adult glioblastoma multiforme”, *Mol Cancer Res*, (2006), **4**, 709.
- [112] Kang S., Bader A. G., Vogt P. K., “Phosphatidylinositol 3-kinase Mutations Identified in Human Cancers are Oncogenic”, *PNAS*, (2005), **102**, (3), 802-807.
- [113] Lee J. W., Soung Y. H., Kim S. Y., Lee H. W., Park W. S., Nam S. W., Kim S. H., Lee J. Y., Yoo N. J., Lee S. H., “PIK3CA is Frequently Mutated in Breast Carcinomas and Hepatocellular Carcinomas”, *Oncogene*, (2005), **24**, 1477–1480.
- [114] Kozaki K., Imoto I., Pimkhaokham A., Hasegawa S., Tsuda H., Omura K., Inazawa J., “PIK3CA Mutation is an Oncogenic Aberration at Advanced Stages of Oral Squamous Cell Carcinoma”, *Cancer Sci*, (2006), **97**, (12), 1351–1358.
- [115] Li S. Y., Rong M., Grieu F., Iacopetta B., “PIK3CA Mutations in Breast Cancer are Associated with Poor Outcome”, *Breast Cancer Research and Treatment*, (2006), **96**, 91–95.