

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

GASTROİNTESTİNAL KANSERLİ HASTALARDA
G PROTEİN β 3 GENİ (GNB3) C 825T POLİMORFİZMİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Özlen TUBAY BAĞDATOĞLU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Uğur ATİK

MERSİN – 2008

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

GASTROİNTESTİNAL KANSERLİ HASTALARDA
G PROTEİN β 3 GENİ (GNB3) C 825T POLİMORFİZMİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Özlen TUBAY BAĞDATOĞLU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Uğur ATİK

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE BK (ÖTB) 2005-1 DR kodlu proje olarak desteklenmiştir.

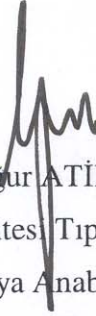
Tez No: 3

MERSİN-2008

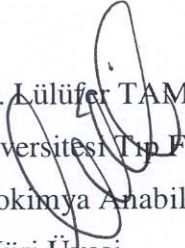
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Gastrointestinal Kanserli Hastalarda G Protein $\beta 3$ Geni (GNB3) C825T Polimorfizminin Değerlendirilmesi” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 25/04/2008



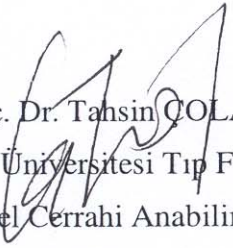
Prof. Uğur ATİK
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Jüri Başkanı



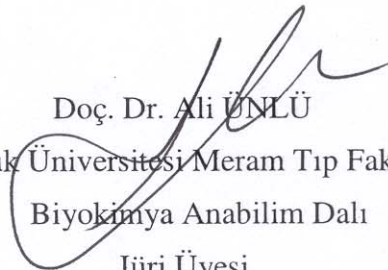
Prof. Dr. Lülüfer TAMER
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Gürbüz POLAT
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

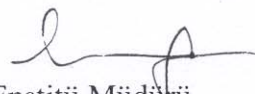


Doç. Dr. Tansin ÇOLAK
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Ali ÜNLÜ
Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 14.05.2008 tarih ve 2008/125 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü
Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Uğur Atik'e saygı ve şükranlarımı sunarım. Tüm eğitim dönemimde ve ayrıca tezimle ilgili her aşamada bana yardımcı olup, yol gösteren Doç. Dr. Gürbüz Polat'a verdiği emek için çok teşekkür ederim.

Biyokimya eğitimim sırasındaki akademik katkılarından dolayı Prof. Dr. Lülüfer Tamer, Doç. Dr. Ali Ünlü, Doç. Dr. Gülçin Eskandari, Doç. Dr. Burak Çimen ve Yrd. Doç. Dr. Necati Muşlu'ya teşekkür ederim. Bu çalışmam sırasında beni manevi olarak destekleyen tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinde yer alan Doç. Dr. Tahsin Çolak'a, tez çalışma grubu örneklerinin toplanması ve hasta değerlendirme aşamalarında yardımcı olan Doç. Dr. Aziz YAZAR'a, ve yine yardımlarından dolayı İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, ME.Ü. Tıp Fakültesi Kan Merkezi ve ME.Ü. Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim. Tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Arzu KANIK ve Arş. Gör. Seval KUL'a teşekkür ederim.

Son olarak, hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez çalışmam sırasında da beni destekleyen, sevgi ve güç veren aileme, eşime ve varlığı hayatıma sonsuz bir anlam katan biricik oğluma çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ÖZET	xviii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Tanım	3
2.1.2.Kanser Nedenleri	3
2.1.2.1. Kanser ve genetik	3
2.1.2.2. Kanser, İmmünite ve Enflamasyon İlişkisi	4
2.2. Gastrointestinal Sistem Kanseri	5
2.2.1.Özofagus Kanseri	5
2.2.1.1. Epidemiyoloji ve Patolojisi	5
2.2.1.2. Etiyolojisi	5
2.2.2.Mide Kanseri	7
2.2.2.1. Epidemiyoloji ve Patolojisi	7
2.2.2.2. Etiyolojisi	9
2.2.3.Kolorektal Kanser	11
2.2.3.1. Epidemiyoloji ve Patolojisi	11
2.2.3.2. Etiyolojisi	13

2.2.4.Pankreas Kanseri	16
2.2.4.1. Epidemiyoloji ve Patolojisi	16
2.2.4.2. Etiyolojisi	17
2.3. Kanser ve sinyal iletimi	18
2.4. Sinyal iletimi	19
2.5. GTP/GDP Bağlayıcı Proteinler (G proteinleri)	21
2.5.1. Heterotrimerik G Proteinlerinin Yapısı	24
2.5.1.1. Heterotrimerik G proteinlerinin alfa alt birimi	25
2.5.1.2. Heterotrimerik G proteinlerinin beta-gama alt birimi	28
2.5.1.3. G Protein Bağlı Reseptörler	30
2.5.1.4. G Proteinlerinin Moleküler Mekanizması	32
2.5.2. G Proteinlerinin İşlevleri	33
2.5.2.1. G Proteininin Hedefleri	37
2.5.3. G Protein Aracılı Sinyal Yolunun Düzenlenmesi	41
2.6. G proteinleri ile ilişkili hastalıklar	42
2.7. GNB3 Geni	48
2.8. GNB3 Gen Polimorfizmleri	48
2.8.1. GNB3 C825T Gen Polimorfizmi Sıklığı	51
2.8.2. GNB3 C825T Gen Polimorfizminin Etkileri	53
2.8.3.GNB3 C825T Gen Polimorfizmi İle İlişkili Hastalıklar	53
2.8.4. GNB3 Gen Polimorfizmi ve Kanser İlişkisi	54
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	56
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	56
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	56
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	57
3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler	58
3.1.3.1 DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar	58
3.1.3.2. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler	59

3.2. DNA İzolasyonu	60
3.2.1. PrensiP	60
3.2.2. Uygulama	60
3.2.3. DNA Kalite ve Verimliliğinin Test Edilmesi	61
3.3. Moleküler Analiz	61
3.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Uygulaması	61
3.3.2. Elektroforez İşlemi	62
3.3.3. Restriksiyon Enzimi Parça Uzunluk Polimorfizmi İşlemi	62
3.3.4. Verilerin Değerlendirilmesi	63
3.4. Lenfosit ve Tümör Belirteçlerinin Analizi	64
3.5. İstatistiksel Analiz	64
4. BULGULAR	65
4.1. Hardy-Weinberg Dengesi	65
4.2. Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyet, yaş ve vücut kitle indeksleri açısından değerlendirilmesi	66
4.3. Kontrol ve hasta gruplarının genotipik açıdan değerlendirilmesi	68
4.4. Hasta ve kontrol gruplarının risk etkenleri açısından değerlendirilmesi	72
4.5. Hasta ve kontrol gruplarının CC/ CT+TT genotip dağılımı açısından değerlendirilmesi	75
4.6. Hasta ve kontrol gruplarının genotip, cinsiyet, vücut kitle indeksi açısından değerlendirilmesi	77
4.7. Kontrol ve hasta gruplarının allelik açıdan değerlendirilmesi	78
4.8. Hasta gruplarının evre, metastaz özelliklerine göre değerlendirilmesi	81
4.9. Hastalık yerlerine göre evre, metastaz özelliklerinin değerlendirilmesi	84
4.10. Hasta Grubuna Ait Yaşam Süresi Analizleri	87
4.11. Hasta ve kontrol gruplarının tümör belirteçleri ve lenfosit değerleri bakımından değerlendirilmesi	94
5. TARTIŞMA	96
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	113

7. KAYNAKLAR	115
EK-1 (Bilgilendirilmiş Onam Formu)	124
ÖZGEÇMİŞ	125

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. G protein bağlı reseptör ve heterotrimerik G protein alt birimleri	22
Şekil 2.2. Heterotrimerik G proteini	24
Şekil 2.3. G protein alt birimlerini kodlayan gen yapıları	26
Şekil 2.4. Heterotrimerik G proteini yapısı	27
Şekil 2.5. Beta- gamma alt birimlerinin yapısı	29
Şekil 2.6. G protein bağlı reseptör yapısı	30
Şekil 2.7. G protein bağlı reseptör tipleri	32
Şekil 2.8. Heterotrimerik G protein etki mekanizması	33
Şekil 2.9. G protein aracılıklı sinyalizasyon mekanizmaları	35
Şekil 2.10. G protein aracılı sinyal yolunun düzenlenmesi	42
Şekil 2.11. GNB3 geni	48
Şekil 2.12. G β 3 ve G β 3s yapıları	51
Şekil 2.13. Dünyada ülkelere göre GNB3 825T allel sıklıkları	52
Şekil 3.1 PCR sonrasında 268 bp'lik GNB3 geni fragmanlarının agaroz jel elektroforezindeki görünümü	63
Şekil 3.2 GNB3 geni PCR ürününün, BseDI restriksiyon enzimi ile kesiminden elde edilen sonuçlar	64
Şekil 4.1. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet açısından dağılımı	66
Şekil 4.2. GNB3 C825T Polimorfizmi genotip frekansları	69
Şekil 4.3. GNB3 C825T Polimorfizminin hastalık yerlerine göre ayrılmış genotip frekansları	70
Şekil 4.4. GNB3 C825T Polimorfizmi allel frekansları	78
Şekil 4.5. GNB3 C825T Polimorfizminin hastalık yerlerine göre ayrılmış allel frekansları	79

Şekil 4.6. Progresyonla seyreden hastalarda genotiplere göre ayrılmış hayatta kalma olasılıkları	88
Şekil 4.7. Stabil seyreden hastalarda genotiplere göre ayrılmış hayatta kalma olasılıkları	89
Şekil 4.8. Progresyonla seyreden ve metastazı olan hastalarda genotiplere göre ayrılmış hayatta kalma olasılıkları	90
Şekil 4.9. Metastazı olmayan fakat progresyon gösteren hastalarda genotiplere göre ayrılmış hayatta kalma olasılıkları	91
Şekil 4.10. Progresyonla seyreden evre I-II hastaların genotiplere göre ayrılmış hayatta kalma olasılıkları	92
Şekil 4.11. Progresyonla seyreden evre III-IV hastaların genotiplere göre ayrılmış hayatta kalma olasılıkları	93

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Özofagus Kanserinin Evrelendirmesi ve Beş Yıllık Yaşam Oranları	6
Çizelge 2.2. Mide Kanserinin TNM Sınıflaması	8
Çizelge 2.3. Mide Kanseri Evrelendirmesi ve Beş Yıllık Yaşam Oranları	9
Çizelge 2.4. Kolorektal Kanserin TNM Sınıflandırması	12
Çizelge 2.5. Kolorektal Kanserin Evrelendirilmesi ve Beş Yıllık Yaşam Oranları	13
Çizelge 2.6. Pankreas Kanserinin Evrelendirilmesi	18
Çizelge 2.7. G protein alfa alt birimlerini kodlayan genler	26
Çizelge 2.8. G protein beta ve gama alt birimlerini kodlayan genler	29
Çizelge 2.9. G protein bağlı reseptörlerin endojen ligandları, reseptör tipleri ve ilişkili oldukları G protein alt sınıfları	36
Çizelge 2.10. Heterotrimerik G proteinlerinin alt gruplarınca düzenlenen efektörler	37
Çizelge 2.11. G Protein bağlı reseptör mutasyonları nedeniyle ortaya çıkan hastalıklar	44
Çizelge 2.12. G Protein α alt birimine ait mutasyonlara bağlı ortaya çıkan hastalıklar	47
Çizelge 2.13. GNB3 gen polimorfizmleri	49
Çizelge 2.14. GNB3 C825T gen polimorfizmine ait genotiplerin etnik dağılımı	52
Çizelge 3.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar ve İçeriği	58
Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol grubunun yaş ortalaması ve cinsiyet açısından Dağılımı	67

Çizelge 4.2. Hastalık yerlerine göre hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalaması ve cinsiyet açısından dağılımı	67
Çizelge 4.3. Hastalık yerlerine göre hasta ve kontrol gruplarının vücut kitle indeksi dağılımı	68
Çizelge 4.4. GNB3 C825T Polimorfizmi genotip dağılımları ve odds oranları	69
Çizelge 4.5. Hastalık yerlerine göre GNB3 C825T Polimorfizmi genotip dağılımları ve odds oranları	71
Çizelge 4.6. Hasta ve kontrol gruplarındaki aile öyküsü, alkol ve sigara kullanımı ve risk oranları	72
Çizelge 4.7. Mide kanserli hasta ve kontrol gruplarındaki aile öyküsü, alkol ve sigara kullanımı ve risk oranları	73
Çizelge 4.8. Kolorektal kanserli hasta ve kontrol gruplarındaki aile öyküsü, alkol ve sigara kullanımı ve risk oranları	73
Çizelge 4.9. Özofagus kanserli hasta ve kontrol gruplarındaki aile öyküsü, alkol ve sigara kullanımı ve risk oranları	74
Çizelge 4.10. Pankreas kanserli hasta ve kontrol gruplarındaki aile öyküsü, alkol ve sigara kullanımı ve risk oranları	74
Çizelge 4.11. GNB3 C825T Polimorfizmi CC ve CT+TT şeklindeki genotip dağılımları ve odds oranları	75
Çizelge 4.12. Hastalık yerlerine göre CC ve CT+TT şeklinde genotip dağılımları ve odds oranları	76
Çizelge 4.13. Hasta ve kontrol grubunun genotip ve cinsiyet açısından dağılımı	77
Çizelge 4.14. Hasta ve kontrol grubunun genotiplere göre vücut kitle indeksleri	78
Çizelge 4.15. GNB3 C825T Polimorfizmi allelik dağılımları ve odds oranları	79
Çizelge 4.16. Hastalık yerlerine göre GNB3 C825T Polimorfizmi allel dağılımları ve odds oranları	80
Çizelge 4.17. Gastrointestinal kanserli hastaların genotip ve hastalık evrelerine göre dağılımı	81
Çizelge 4.18. Gastrointestinal kanserli hastaların genotip ve metastaz	81

varlığına göre dağılımı	
Çizelge 4.19. Gastrointestinal kanserli hastaların genotip ve hastalık evrelerine göre dağılımı (CC/ CT+TT)	82
Çizelge 4.20. Gastrointestinal kanserli hastaların genotip ve metastaz varlığına göre dağılımı (CC/ CT+TT)	82
Çizelge 4.21. Gastrointestinal kanserli hastaların allel ve hastalık evrelerine göre dağılımı	83
Çizelge 4.22. Gastrointestinal kanserli hastaların allellere ve metastaz varlığına göre dağılımı	83
Çizelge 4.23. Hastalık yerlerine göre kanserli hastaların genotiplere ve evrelere göre dağılımı	84
Çizelge 4.24. Hastalık yerlerine göre kanser hastalarının genotiplere ve metastaza göre dağılımı	85
Çizelge 4.25. Hastalık yerlerine göre kanserli hastaların allellere ve evrelere göre dağılımı	86
Çizelge 4.26. Hastalık yerlerine göre kanser hastalarının allellere ve metastaza göre dağılımı	87
Çizelge 4.27. Hasta ve kontrol gruplarının lenfosit değerleri ve tümör belirteçleri açısından değerlendirilmesi	94

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
3'-UTR	3' translasyonsuz bölge
5-HT ₄	Serotonin (5-hidroksi triptamin)
A	Adenin
AC	Adenilil siklaz
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AIB-1	Meme kanseri amplifikasyon geni
Akt	Timoma viral onkogen homoloğu
Ala	Alanin
ANF	Atriyal natriüretik faktör
AP-1	Adaptör protein kompleksi
APC	Adenomatosis poliposis koli geni
Arf	ADP ribozilasyon faktörü
Arg	Arjinin
ATP	Adenozin Trifosfat
BAX	Bcl-2 ilişkili x proteini
Bcl-2	B-cell CLL/lenfoma 2
bp	Baz çifti
BRCA-2	Meme kanseri tip 2 etkileyici protein
C	Sitozin
CA 19-9	Karbohidrat antijeni 19-9
Ca ⁺⁺	Kalsiyum
CAM Kinaz	Kalsiyum/kalmodülin bağımlı protein kinaz
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CDKN2	Siklin bağımlı kinaz 2a/p16
CEA	Karsinoembriyjenik antijen
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
CI % 95	% 95 Güven Aralığı
c-met	Mezenkimal epitelyal geçiş faktörü

Cl ⁻	Klor
c-myc	Onkogenik transkripsiyon faktörü
COX 2	Siklooksijenaz 2
CRE	cAMP yanıt elemanı
CREB	cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein
CXCR4	Kemokin (C-X-C motif) reseptörü 4
Cys	Sistein
DAG	Diaçilgliserol
DCC	Kolorektal karcinoma gen delesyonu
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
d-NTP	Deoksinükleotid trifosfat
DPC	Pancreas kanser gen delesyonu
DRY	Aspartat-arjinin-tirozin
DT-dioforaz	NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz
EDTA	Etilen dinitro tetra asetik asit
EF	Translasyon elongasyon etkeni
EGFR	Epidermal büyüme etkeni reseptörü
Elk-1	ETS domain transkripsiyon faktörü
ERB-2	Eritroblastik lösemi viral onkogen homologu 2
EtBr	Ethidyum bromid
FAP	Ailesel adenomatozis polipozis geni
FHIT	Frajil histidin triad geni
Fmlp	N-formil-metiyonil-lözil-fenilalanin
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
G protein	GDP/GTP (Guanin nükleotid) bağlayıcı protein
G	Guanin
GABA	Gamma amino bütirik asit
GATA-4	GATA motifi bağlayıcı protein 4
GDP	Guanozin Difosfat
GHRH	Büyüme hormonu salgılatıcı hormon
GIRK	G protein ile düzenlenen potasyum kanalı
Gln	Glutamin
GNAI-2	G protein alfa inhibe edici polipeptit

GNAS-1	G protein alfa uyarıcı kompleks lokusu
GNB3	G protein beta3 geni
GPCR	G protein bağlı reseptör
GRK	G proteinle düzenlenen kinaz
GTP	Guanozin Trifosfat
H ⁺	Hidrojen
HER-2	İnsan epidermal büyüme etkeni reseptörü
HGF/SF	Hepatosit büyüme etkeni/scatter faktörü
His	Histidin
IGFIIR	İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü II
Int.	İntron bölgesi
IP3	İnozitol trifosfat
I-κB	NF-kappa B inhibitörü
K ⁺	Potasyum
k-ras	Kirsten rat sarkoma 2 viral onkogen homologu
k-sam	s-adenozil metiyonin taşıyıcısı
LH	Lüteinizan hormon
LKB-1	Çok fonksiyonlu tümör baskılayıcı kinaz-1
LOH	Heterozigotluğun kaybı
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
Mg ⁺⁺	Magnezyum
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mRNA	Haberci Ribonükleik Asit
M	DNA standartı
MSH	Melanosit stimüle edici hormon
MSI	Mikrosatellit instabilite
n	Denek Sayısı
Na ⁺	Sodyum
NAD	Nikotin adenil dinükleotid
Neu	Nöroglioblastoma onkogeni
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B
NO	Nitrik oksit
OR	Odds oranı
p	Anlamlılık değeri

PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDE	Fosfodiesteraz
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme etkeni
PI3K	Fosfoinozitol 3 kinaz
PKC	Protein kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
PTH	Parathormon
Rab	Ras ailesine bağlı bir GTPaz
Rac	Rho ile ilişkili bir küçük GTPaz
raf	rasla ilişkili GTPaz homologu
ral	rasla ilişkili GTPaz homologu
Ran	Ras ailesine bağlı bir GTPaz
ras	Rat sarkoma virus onkogeni
Rb	Retinoblastoma
Rel	Retiküloendotelyozis viral onkogen homologu
RFLP	Restriksiyon enzim parça uzunluk polimorfizmi
RGS	G protein sinyal düzenleyicisi
Rho	Ras ailesine bağlı bir GTPaz
Rho-GEF	Rho guanin nükleotid değiştirici faktör
RTK	Reseptör tirozin kinaz
Sar1	Ras ilişkili protein 1
Ser	Serin
SD	Standart sapma
SMAD	Drosophila mad homologu
SNP	Single nucleotide polymorphism
src	src sarkoma viral onkogen homologu
SRE	Serum yanıt elemanı
STK 11	Serin/treonin kinaz 11
T	Timin
TBE	Tris-borat-EDTA
TGF β	Transforme edici büyüme etkeni beta
TGF β R	Transforme edici büyüme etkeni beta reseptörü
Tm	Erime derecesi

TNF	Tümör nekroz etkeni
TNM	Tümör, lenf nodu, metastaz
TRH	Tirotropin salgılatıcı hormon
t-RNA	Transfer edici ribonükleik Asit
TSH	Tiroksin stimüle edici hormon
V2	Vazopressin
VDCC	Voltaj bağımlı kalsiyum kanalı
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
μM	Mikromol/litre

ÖZET

Gastrointestinal Kanserli Hastalarda G Protein β 3 Geni (GNB3) C825 T Polimorfizminin Değerlendirilmesi

Kanser yüzyılımızda sağlık problemlerinin başında gelmektedir. Neoplastik büyüme, malin hücre topluluğunun kontrolsüz yayılım gösterdiği otonom bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Kanseri tetikleyen en önemli mekanizmalardan birisi de sinyal ileti yollarını da etkileyen genetik hasardır.

Heterotrimerik G proteinleri transmembran reseptörlerinin bir kısmının önemli bir bileşenidir ve hücre içi sinyal iletiminin düzenlenmesinde rol alırlar. Heterotrimerik G proteinleri α , β , ve γ olmak üzere üç alt birimden meydana gelmektedir. Heterotrimerik G proteinlerinin hücre büyümesi ve mitozdaki rolleri nedeniyle tümör gelişimi ve büyümesi ile ilişkili olduğu düşünülebilir.

GNB3 geni G protein β 3 alt birimini kodlayan gendir. Bu gene ait çeşitli polimorfizmler arasında ise en önemlisi ve çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş olanı C825T polimorfizmidir. Ekzon 10'da 825. nükleotidde C-T şeklinde tek baz değişikliği meydana gelirken, Ekzon 9'daki alternatif RNA kaymasına (splicing) bağlı olarak da 123 baz çiftlik bir delesyon meydana gelir. Bu durum T allel taşıyıcılarında bir splice varyant varlığı ve sinyal iletimindeki artış ile sonuçlanır.

Bu noktadan hareket ederek G protein β 3 alt birim (GNB3) genindeki C825T tek nükleotid polimorfizminin gastrointestinal kanserlerdeki potansiyel rolünü belirlemek amacıyla 202 gastrointestinal kanser hastası ve 191 sağlıklı bireyin genetik analizlerini yapılarak, genotip ve allel sıklıkları araştırılmıştır. Ayrıca, bu gen polimorfizminin kanser progresyonu, metastaz özellikleri, yaşam süresi gibi faktörler üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Çalışmamızda genotip frekansları bakımından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Ayrıca T alleli taşıyıcılarının hastalık riski açısından C allelinden farklı olmadığına karar verilmiştir. Hasta grubunda bu polimorfizmin hastalık evresi ve uzak metastaz varlığı ile ilişkisi bulunduğu gözlenmiştir ($p=0,000$). Yine TT genotipinde hastalığın daha hızlı progresyon gösterdiği ve yaşam süresinin kısaldığı izlenmiştir ($p=0,045$).

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin kesin mekanizması açıklanamamakla birlikte, G protein bağlı reseptör ve ilişkili sinyal yollarının kanser invazyon ve metastaz sürecinde rolü olduğu düşünülebilir. Sonuç olarak, GNB3 geni C825T polimorfizminin gastrointestinal kanser hastalarında progresyon takibinde kullanılabilir bir prognostik belirteç adayı olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Kanser, GNB3, C 825T polimorfizmi, T allel, Progresyon.

ABSTRACT

The Evaluation of G Protein $\beta 3$ Gene (GNB3) C825 T Polymorphism in Gastrointestinal Cancers

Cancer is one of the most important health problems in the new century. Neoplastic growth is often regarded as an autonomous process driven by uncontrolled expansion of malignant cell population. Genetic damage, including the signaling pathways, is believed to be the main triggering mechanism of cancer.

Heterotrimeric G proteins are important components of a multitude of transmembran receptors and are involved in the regulation of intracellular signaling pathways. Heterotrimeric G proteins consist of three subunits as α , β , and γ . Because of their role for controlling cell growth and mitosis, activity of heterotrimeric G proteins may be related to the growth and development of tumors.

GNB3 is the gene that encodes the G protein $\beta 3$ subunit. There are numerous polymorphisms of this gene but C825T polymorphism is the most important one which is related with several diseases. There is a single base exchange as C-T at the nucleotide 825 in exon 10, and an alternative splicing associated with 123 bp deletion in exon 9. This condition appears to induce a splice variant in T allele carriers leading an enhanced signal transduction.

Beginning with this point of situation, we determine the potential role of G protein $\beta 3$ subunit gene (GNB3) C825T single nucleotide polymorphism in gastrointestinal cancers. We genetically analysed and investigate the genotype and allele frequencies of 202 gastrointestinal cancer patient and 191 healthy control for this purpose. Besides, the effects of this gene polymorphism on some factors as cancer progression, characteristics of metastasis and survive was examined.

In our study, no statistically difference was found between the patient and control groups for genotype frequencies. Also, we decided that T allele carriers were not different from C allele by means of the disease risk. In patient group, we observed a relation with this polymorphism and staging, also distant metastasis ($p=0,000$). There was a rapid progression of disease and a short survival period in TT genotype as well ($p=0,045$).

Although there was no explanation for the exact mechanisms of the data obtained by this study, the roles of G protein coupled receptors and related signaling pathways can be considered in cancer invasion and metastasis. In conclusion, C825T polymorphism of GNB3 gene might be a candidate prognostic marker in gastrointestinal cancer patient follow-up for progression.

Key words: Cancer, GNB3, C 825T polymorphism, T allele, Progression.

1. GİRİŞ

Neoplastik büyüme, malign hücre popülasyonunun kontrolsüz yayılım gösterdiği otonom bir süreçtir. Neoplazi patogeneğinde pek çok etken rol oynamakla birlikte, karmaşık moleküler mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılammıştır. Pek çok kanser tipi moleküler, biyokimyasal ve hücresele özelliklere sahiptir. Bunlar, hücrenin büyüme sinyallerine karşı kendi kendine yetmesi, büyümeyle inhibe eden sinyallere duyarsızlığı, apoptozisten kaçınması, sınırsız kopyalanma potansiyeli, anjiyogenezi devam ettirmesi, doku invazyonu ve metastazdır (1). Neoplaziyi tetikleyen önemli mekanizmalardan biri genetik temelli hasardır. Oluşan mutasyonlar hücre kontrolünün kaybına neden olur (1). Kanserde gözlenen pek çok olaydan biri de hücresele immün yetmezlik gelişimidir, fakat immün yetmezliğin mekanizması tam anlaşılammıştır (2).

Hücre büyümesi ve mitozdaki rolleri nedeniyle heterotrimerik G-proteinlerinin tümör gelişimi ve büyümesi ile ilişkili olduğu düşünülebilir (3). Heterotrimerik G-proteinleri transmembran reseptörlerinin bir kısmının önemli bir bileşenidir ve hücre içi sinyal iletiminin düzenlenmesinde rol alırlar (3). Pek çok hormon, nörotransmitter, kemokin ve lokal mediatör G-protein bağı reseptörlere bağlanarak etki gösterirler (4).

Heterotrimerik G-proteinleri α , β , ve γ olmak üzere üç altbirimden meydana gelmektedir. G-proteinleri GDP bağı iken heterotrimerik ve inaktif formda bulunurlar. GTP bağlanması ile GTP- $G\alpha$ alt birimi, $G\beta\gamma$ alt biriminden ayrılır. Böylece G-proteinleri hücre içi sinyal iletimindeki rollerini hem $G\alpha$, hem de $G\beta\gamma$ alt birimleri üzerinden gösterebilirler (4). β -alt birimi, γ -alt birimine sıkıca bağıdır ve sadece $\beta\gamma$ kompleksi halinde iken işlev gösterir (5). Yapılan çalışmalar genellikle G-proteinlerinin α -alt birimi üzerinden yürütülmüştür (6,7,8). G-protein $\beta\gamma$ alt birimi ile yapılan çalışmalar daha sınırlıdır. GNB3 geni G-protein $\beta\beta$ -alt birimini kodlayan gendir. Bu gene ait çeşitli polimorfizmler üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, C825T, G814A, A657T, C1429T, A(-350)G gibi polimorfizmlerin üzerinde durulmaktadır. Bunların arasında ise en önemlisi ve çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş olanı C825T polimorfizmidir (9).

GNB3 geni 12. kromozomda yer alır ve 11 ekzondan oluşmaktadır. Ekzon 10'da 825. nükleotidde C-T şeklinde tek baz değişikliği meydana gelen 825T alleli bir splice

varyant (β s) oluşumundan sorumludur. Ekzon 9'daki alternatif RNA kaymasına (splicing) bağlı olarak 123 baz çiftlik bir delesyon meydana gelir. Bu durum wild type (CC) genotipe göre 41 aminoasitlik bir kayıpla sonuçlanır. Böylece G-proteininin GTP bağlamasına yönelik uyarımı ve $G\alpha_{i2}$ -protein aktivitesi artar (10,11). GNB3 genindeki splice varyant üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda T allel taşıyıcılarının hipertansiyon, ateroskleroz, inme, obezite, immün yanıtta artış gibi çeşitli durumlarla ilişkili olduğu gözlenmiştir (10,12,13,14,15,16). T allel taşıyıcılarında β s-alt birimi $G\alpha_{i2}$ ve $G\gamma_5$ ile beraber işlev göstermektedir (10). Yine T allel taşıyıcılarında immün yanıt artmaktadır (14,17). Homozigot 825C allel taşıyıcılarında ise azalmış $G\alpha_{i2}$ -protein aktivitesi izlenmektedir (10). Ayrıca GNB3 geni T hücre yanıtının artışı ve inflamatuvar yanıtla da ilgilidir. Karsinogenezde inflamatuvar değişiklikler de önemli rol almaktadır. Bu nedenlere bağlı olarak GNB3 C825T gen polimorfizminin kolorektal kanserli hastalarla ilişkisi olduğu düşünülmektedir (18).

G-proteinleri ile ilgili gen polimorfizmleri çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş olmasına karşın kanser ile ilişkisine yönelik yayınlanmış çok sayıda araştırma yoktur. G-proteinlerinin hücre sinyalizasyonundaki rollerinin önemi açıktır. Bu nedenle hücre büyümesi, mitoz, immün yanıtta rollerinin tümörögenезle ilişkilendirilmesi yararlı olacaktır. G-protein GNB3 geni C825T polimorfizminin kanser hastalığıyla ilişkisi hakkında bugüne kadar kesin bir yorum yapılamamıştır. Bu konuda yapılacak araştırmalar hastalığın patogenezinde ve tedavisinde önemli gelişmeler sağlayabilecektir ve henüz nedenleri, gelişimi, ilerlemesi tam olarak anlaşılammış olan kanser hastalığının etiolojisinin açıklanabilmesine yeni bir boyut kazandırabilecektir. Çalışmamızdaki amaç G-protein β 3-alt birim (GNB3) genindeki C825T tek nükleotid polimorfizminin gastrointestinal kanserlerdeki potansiyel rolünü incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.KANSER

2.1.1.Tanım

Kanser homeostatik feed-back mekanizmalara yanıt veren normal hücrelerin bu mekanizmaların kontrolünden çıkıp kontrolsüz ve spontan olarak çoğalabilen ve komşu dokulara invazyon yapabilen hücre şekillerine dönüşmeleridir. Neoplastik büyüme, malign hücre popülasyonunun kontrolsüz yayılım gösterdiği otonom bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Neoplazi patogenezinde pek çok etken rol oynamakla birlikte, karmaşık moleküler mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılammıştır. Pek çok kanser hücresi kanser tipine bağlı olarak moleküler ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Bu özellikler, büyüme sinyallerine karşı kendi kendine yetmesi, büyümeyi inhibe eden sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçınması, sınırsız kopyalanma potansiyeli, angiogenezin sürdürülmesi, doku invazyonu ve metastazı kapsamaktadır (19).

2.1.2.Kanser Nedenleri

Çeşitli karsinojenler (viral, kimyasal, fiziksel gibi) nükleotid değişikliklerine neden olur ve normal hücreler yeni bir hücre tipine, yani kanser hücresine dönüşür. Bu hücreler, sınırsız mitoz yeteneği, metastaz yapabilme ve immün sistemin savunma yapmasını engelleme gibi yeni kazanılmış bazı özelliklere sahiptir. Kanser oluşumu başlıca dört durumla ilgilidir: karsinojen miktarı, karsinojen etkisinde kalma süresi, genetik yatkınlık ve uyarıcı etkenlerin varlığı (20).

2.1.2.1. Kanser ve genetik

Neoplazi gelişme riskinden sorumlu tutulan yüzlerce genetik kusur bulunmaktadır. Çocukluk çağı kanserlerinin %30'dan fazlası genetik yatkınlığı olan bireylerde izlenmekteyken, erişkinlerde bu oran %5–10 kadardır. Hastalığı genetik geçiş oranı düşük gibi görünmesine karşın, daha önemli bir etken olduğu belirtilen çevresel karsinojenlerin etkileri ise kişilerdeki genetik varyasyonlar nedeniyle değişiklik göstermektedir. Kalıtsal olarak kansere yatkınlık yaratan genler sıklıkla hücre büyüme ve farklılaşmasının kontrolünde, DNA onarımında ve genomik bütünlüğün sağlanmasında rol almaktadırlar (21).

Büyüme etkenleri, sitokinler, ilgili reseptörler, adezyon molekülleri, G-proteinleri, çeşitli kinazlar, transkripsiyon etkenleri, tümör baskılayıcı proteinler vb. pek çok molekül sinyal yollarında rol almaktadır. Çeşitli genetik değişikliklere uğramaları sonucunda işlevlerinde meydana gelen değişiklikler, sinyal ileti yollarının normal akışını bozarak hücrelerin kontrolsüz çoğalmalarına ve büyümelerine neden olmaktadır (22).

2.1.2.2. Kanser, İmmünite ve Enflamasyon İlişkisi

Karsinogenezde inflamatuvar değişikliklerin önemli rolü bulunmaktadır. Kronik enflamasyon kanser, diyabet, kardiyovasküler, pulmoner ve nörolojik hastalıklara neden olabilir. Kronik enflamasyon tümörögenезin, hücresel dönüşüm, apoptozisin baskılanması, proliferasyon, anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi çeşitli evrelerinde kritik rol oynamaktadır. Ayrıca tümörün ilaç ve radyoterapiye karşı direnç özellikleri de kronik enflamasyonla ilgilidir (23).

Kemokinler, pleotropik biyolojik etkileri olan bir protein ailesidir. Kanserin ilerlemesi, anjiyogenez, enflamasyon, hücre toplanması, lökositlerin enflamasyon alanına göçünün düzenlenmesi gibi çeşitli rolleri vardır (23). Primer tümör metastazlarında tümör hücreleri ve konakçı hücreleri tarafından kemokinler ve bunlara ait reseptörler sentezlenmektedir. Kemokinlerin malinedeki rolleri, tümöre lökosit infiltrasyonunu indüklemek ve tümörle ilişkili makrofajlar, T hücreleri ve dendritik hücreler üzerinden immün işlevleri düzenlemek, tümör hücrelerinin kendilerine özgü metastaz bölgelerine yönelmesini kontrol etmek, anjiyogenezi düzenlemek ve direk olarak tümör hücresine etki ederek hücrenin malinite ile ilişkili işlevlerini kontrol etmek şeklinde sıralanabilir (24).

Kanserlerde hücresel immün yetmezlik de görülmektedir. Bu immün yetmezlik genellikle T lenfosit sayısında azalma, monosit işlevlerinde azalma vb. şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Kansere hastalarında immün düzenleyici T hücreleri aracılığıyla antitümör immünite baskılanmaktadır (2).

2.2.GASTROİNTESTİNAL SİSTEM KANSERLERİ

2.2.1.ÖZOFAGUS KANSERİ

2.2.1.1. Epidemiyoloji ve Patoloji

Özofagus kanseri gastrointestinal sistem maliniteleri arasında görülme sıklığı bakımından üçüncü sırada yer almaktadır. Dünya çapında en sık görülen on kanserden biridir (25). Özofagus kanseri erken evrelerde tespit edilemezse beş yıldan daha kısa süre içinde fatal seyretmektedir. Özofagusun en sık görülen tümörü skuamöz hücreli kanserdir. ABD’de özofagus tümörlerinin %60’ı skuamöz hücreli tümörlerdir. Özofagusun adenokanserleri ise ikinci sıklıkta izlenmektedir. Diğer malin tümörleri ise oldukça nadir görülmektedir (26,27).

Özofagus kanserinin evrelendirmesi ve beş yıllık yaşam oranları çizelge 2.1’de verilmiştir.

2.2.1.2. Etiyoloji

Özofagus kanserinin nedenleri olarak genetik, çevresel, diyetsel, iyatrojenik ve enfeksiyöz etkenler sayılabilir. Ayrıca tümör insidansında oldukça geniş bir coğrafik ve kültürel değişkenlik de izlenmektedir (26).

Skuamöz hücreli özofagus kanserinin nedeni için tek bir etkenin belirlenmesi olanaklı değildir. Özofagus kanserinde rolü olan risk etkenlerinin aralarında karmaşık etkileşimler vardır ve bunların etkileri aditif veya sinerjistik olabilmektedir (26).

Etiyolojik etkenler arasında başlıca diyetdeki tütülenmiş yiyecekler, turşu halindeki sebzeler, molibdenyum ve çinko gibi mineral eksiklikleri, sigara ve alkol tüketimi, akalazya, tylozis gibi hastalıklar ve insan papilloma virüsü sayılabilir (27).

Çevresel etkenler arasında coğrafik lokalizasyon önemlidir. Kuzey Çin, İran ve Rusya’nın bazı kesimlerinde sık görülmektedir. Endemik bölgelerde birçok çevresel özellik izlenmektedir. Topraktaki düşük molibdenyum düzeyleri, topraktaki tuz oranı, termal hasarlanma, hava kirliliği, su kirliliği bunlar arasındadır (26). Diyetsel etkenler arasında diyetdeki vitamin A, E ve C, niasin, riboflavin, çinko eksiklikleri, alkol ve sigara kullanımı, aflatoksin ve asbestoz gibi karsinojenlere etkisinde kalmak, nitrozaminler, çeşitli mikotoksinler ve retinol içeren gıdalar sayılabilir (26). Kronik özofagus irritasyonu da etiyojide önemlidir (26). Düşük sosyoekonomik koşullar da özofagus

kanseri gelişiminde rol almaktadır. Siyah ırkta beyazlara oranla hastalık daha sık görülmekte ve daha agresif seyretmektedir (26).

Özofagus kanserinin genetik nedenleri henüz kesinleşmiş değildir. Otozomal dominant kalıtılan tylozis hastalığında genetik geçiş izlenmektedir ve bu hastalığı taşıyan bireylerde % 95 oranında özofagus kanseri gelişmektedir (26).

Flow-sitometrik ve moleküler çalışmalar sonucunda özofagus kanserlerindeki klonal hücrelerde hücre siklusunun normalden farklı bir şekilde düzenlendiği ortaya konulmuştur. Genelleme yapıldığında genomik instabilitenin özofagus mukozasında histolojik anormalliklere neden olduğu ve hücre siklusunun düzenindeki bozulmanın da malitenin progresyonunda rol aldığı söylenebilir. Özofagus kanserlerinde pek çok onkogen ve tümör baskılayıcı gen mutasyonu izlenmektedir ve bunlar hücre siklusunu G1 sınırlanma noktasında bozarak etkilemektedir (25). Özofagus adenokarsinomları ile ilgili olarak çeşitli protoonkogenlerde (epidermal büyüme etkeni reseptörü (EGFR), HER-2/NEU/ErbB2, siklin D, cathepsin B ve GATA-4, K-ras, gibi) amplifikasyon izlenmektedir. Retinoblastoma (Rb), p53, p16, gibi tümör baskılayıcı genlerde ise mutasyonlar sonucu inaktivasyon meydana gelmektedir.(25,28).

Çizelge 2.1: Özofagus Kanserinin Evrelendirmesi ve Beş Yıllık Yaşam Oranları (27)
(T: Tümör, N: Lenf nodu, M: Uzak metastaz)

Tümör Evresi	TNM Sınıflaması	5 Yıllık Yaşam Oranı
0	T _{is} , N ₀ , M ₀	%100
I	T ₁ , N ₀ , M ₀	%78,9
IIA	T ₂ , N ₀ , M ₀	%37,9
	T ₃ , N ₀ , M ₀	
IIB	T ₁ , N ₁ , M ₀	%27,3
	T ₂ , N ₁ , M ₀	
III	T ₃ , N ₁ , M ₀	%13,7
	T ₄ , N _{herhangi} , M ₀	
IV	T _{herhangi} , N _{herhangi} , M ₁	%0

2.2.2.MİDE KANSERİ

2.2.2.1. Epidemiyoloji ve Patoloji

Mide kanserinin insidansı 1930'lerden beri, Amerika'daki endüstriyel ve ekonomik gelişme ile birlikte yaşam koşullarındaki değişmeye paralel olarak, düşmeye başlamıştır. Dünyanın birçok ülkesinde mide kanseri insidasının düşmesinin aksine gelişmekte olan ülkelerde mide kanseri sıklığında artış gözlenmektedir (29). Türkiye, Afrika, Asya'nın doğusu, Kuzey Amerika ve sanayileşmiş, modern yaşam standartlarına sahip Japonya'da mide kanseri insidansı yüksektir (30,31). Ülkeler arası farklılık kadar ülke içinde de mide kanseri insidansında farklılıklar görülür. Büyük şehirler ve sosyo-ekonomik bakımdan düşük olan bölgelerde mortalite hızı yüksektir (32). Aynı bölgede yaşayan farklı etnik gruplar arasında da mide kanseri insidansı önemli derecede varyasyon gösterir (29).

Mide kanseri insidansı yaş ile artış göstermektedir. Hastaların birçoğu 50–70 yaşları arasındadır. 30 yaş altındaki hasta sayısı çok azdır (29). Mide kanseri erkeklerde kadınlara oranla daha yaygındır, yaklaşık olarak erkek/kadın oranı mide kanseri insidansının yüksek olduğu bölgelerde 2:1, düşük olduğu bölgelerde 3:2'dir (33).

Mide kanseri mukozal bir hastalık olarak başlamaktadır ve kanser oluşumuna dek uzun bir bekleyiş dönemi bulunur. Yaşamın erken evrelerinde başlayan değişiklikler gastrite ve ardından displazi ve kansere kadar ilerlemektedir. Hastalık belirtilerinin iyi huylu hastalıklarla benzerlik göstermesi nedeniyle tanının zorlaşması ve tedaviye geç başlanması mide kanserinin mortalitesini artırmaktadır (34).

Mide kanserlerinin yaklaşık % 90'ı adenokarsinomdur. Non-hodgkin lenfoma ve leyomiyosarkomlar geri kalan % 10'luk kısmı oluşturmaktadır (29). Mide kanseri mikroskopik olarak selüler ve ekstraselüler yapısı temel alınarak çeşitli gruplara ayrılmıştır. Gland yapısının derecesine, mukus salgılayabilme kapasitesine bağlı olarak iyi, orta ve az diferansiye olmuş olarak sınıflandırılabilir. Klinisyenler ile patologlar arasında bir korelasyon sağlamak için Lauren, mide kanserini diffüz tip ve intestinal tip şeklinde iki gruba ayırmıştır (32,35,36). Mide kanseri mide duvarında invazyon derecelerine göre erken ve ilerlemiş mide kanserleri olarak ikiye ayrılmıştır. Erken mide kanseri lenf nodu tutulumu olmaksızın invazyonun derinliği mukoza ve submukozada sınırlanmış olan bir tümör şeklidir (32). İlerlemiş mide kanserinde tümör, muskularis

propria tabakasını geçmiş, uzak ve yakın yayılım beraberdır. Tedavi şansı ise çok azdır (32,35).

Mide kanserinin sınıflandırma, evrelendirme ve beş yıllık yaşam oranları çizelge 2.2 ve 2.3’de verilmiştir.

Çizelge 2.2: Mide Kanserinin patolojik TNM Sınıflaması (37)
(T: Tümör, N: Lenf nodu, M: Uzak metastaz)

Tümör Evresi (T)	Tanımlama
T_{is}	Karsinoma insitu, intraepitelyal tümör.
T₁	Tümör lamina propria veya submukozadadır.
T₂	Tümör muscularis mukozaya veya subserozaya geçmiştir.
T₃	Tümör serozaya invaze olmuştur.
T₄	Tümör bitişik yapıları işgal etmiştir.

Lenf Nodu Evresi (N)	Tanımlama
N₀	Lenf nodu tutulumu yoktur.
N₁	1-6 bölgesel lenf nodunda metastaz vardır.
N₂	7-15 bölgesel lenf nodunda metastaz vardır.
N₃	15’den fazla bölgesel lenf nodunda metastaz vardır.

Uzak Metastaz Evresi (M)	Tanımlama
M₀	Uzak metastaz yoktur.
M₁	Uzak metastaz vardır.

Çizelge 2.3: Mide Kanseri Evrelendirmesi ve Beş Yıllık Yaşam Oranları (37)
(T: Tümör, N: Lenf nodu, M: Uzak metastaz)

Tümör Evresi	TNM Sınıflaması	5 Yıllık Yaşam Oranı
0	T_{is}, N_0, M_0	
IA	T_1, N_0, M_0	
IB	T_1, N_1, M_0 T_2, N_0, M_0	%84-91
II	T_1, N_2, M_0 T_2, N_1, M_0 T_3, N_0, M_0 T_2, N_2, M_0	%61-72
IIIA	T_3, N_1, M_0 T_4, N_0, M_0	%29-44
IIIB	T_3, N_2, M_0 T_4, N_{1-3}, M_0	
IV	T_{1-3}, N_3, M_0 $T_{herhangi}, N_{herhangi}, M_1$	%9-25

2.2.2.2. Etiyoloji

Mide kanseri gelişiminde artmış riskle ilişkili pek çok etken belirlenmiştir. Ancak etiyojisi henüz tam olarak belirlenememiştir (38). Bunlar arasında *H. pylori* ve Epstein-Barr enfeksiyonları, sigara ve alkol kullanımı, mesleki karsinojenlerin etkisinde kalma, tuzlu veya tuzlanmış et, konserve, ızgara yiyecekler ve kızarmış yiyeceklerle beslenme, iyi huylu mide ülseri için yapılmış mide ameliyatları ile düşük sosyoekonomik durum sayılabilir. Ayrıca sebze, meyve, sarımsak yemek ve yeşil çay içme ile mide kanseri arasında negatif ilişkiler bildirilmektedir. Bu risk etkenlerinin farklı oranlarda etki etmesi bu etkenlere maruz kalınan süre, bireyin sosyal yapısı ve etnik kökeni ile ilişkilidir (39,40,41).

Tip A kan grubu, pernisiyöz anemi, aile öyküsü, kalıtsal nonpolipozis kolon kanseri, Li-Fraumeni sendromu ise mide kanserine neden olan genetik etkenlerdendir. (41). Bu nedenlerin dışında midede olabilecek bazı hastalıkların kanser oluşumunu

kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Bu hastalıklar; adenomatöz gastrik polipler, kronik atrofik gastrit, intestinal metaplazi, pernisiyöz anemi ve Ménétrier hastalığıdır (29,33,38,41). Kanser araştırması alanındaki ilerlemeler mide kanserinin gelişiminden ve ilerlemesinden birçok genetik etkenin sorumlu olduğunu göstermiştir (42). Yapılan çalışmalar mide kanserinin birçok aşamada meydana gelen genetik değişimlerin birikmesi sonucu ortaya çıktığını göstermektedir (42,43,44). Mide kanserindeki genetik anormalliklerin başında çeşitli genlerdeki delesyon ve supresyonlar (sıklık sırasına göre p53, FHIT, APC, DCC, E-cadherin gibi), amplifikasyon ve artmış ekspresyonlar (sıklık sırasına göre COX-2, HGF/SF, VEGF, c-met, AIB-1, β -catenin, k-sam, ras, c-erb B-2 gibi), instabilite ve DNA anöploidi gelmektedir (37)

Genetik veya genomik instabilitenin çoklu gen anomalilerinde arka planda önemli bir rol aldığı düşünülmektedir (45). Mikrosatellit instabilitesinin (MSI) temel nedeninin DNA mismatch onarım mekanizmasındaki hatalar olduğu düşünülmektedir. İnsan mide kanserlerindeki mikrosatellit instabilite sıklığı incelenen mikrosatellit türü ve sayısına bağlı olarak değişse de ortalama %16–39 arasındadır. MSI diffüz ve intestinal tip kanserlerde pek görülmez. Genellikle adenomalar ve intestinal metaplazide görülür (42,45,46).

Adenomatöz polipozis koli (APC), kolorektal kanser (DCC) ve p53 genindeki mutasyon veya heterozigotluğun kaybı (LOH) ile bu genlerin inaktivasyonu mide kanserinde önemli bir rol oynamaktadır (42,47). p53 lokusunda heterozigotluğun kaybı veya mutasyonu, mide kanserlilerin histolojik tipten bağımsız olarak yaklaşık % 60'ında belirlenmiştir (43,45). APC gen mutasyonu kolorektal kanserde olduğu gibi mide kanserinde de görülmektedir. Yapılan çalışmalarda iyi diferansiye olmuş tip mide kanserlilerin yaklaşık % 50'sinde APC gen mutasyonunun olduğunu gösterilmiştir (45).

Hücre adezyon molekülleri tümör baskılayıcı olarak da görev alırlar (45,48). Somatik E-cadherin mutasyonları tüm diziyi veya dizinin bir kısmını mRNA'dan kaldıran delesyonlar veya tek nükleotid değişimine neden olan nokta mutasyonlardır (42,48). Diffüz tip tümörlerinin % 50'sinde E-cadherin mutasyonu belirlenmiştir (48). E-cadherin pozitif hastaların, negatif hastalara oranla yaşam sürelerinin 3-5 yıl daha fazla olduğunu ortaya konulmuştur (46).

Tirozin kinaz reseptörlerini kodlayan c-met, k-sam ve c-erb2 gibi birçok onkogenin değişimi mide kanseri oluşumunda önemli rol oynamaktadır (49).

Bcl2 onkogeni hücre ölümünü bloke eden mitokondriyal iç membran proteinini kodlar. Bcl2 mRNA'sı mide kanserli dokularda ve hücre kültürlerinde çeşitli seviyelerde eksprese edilir. Az diferansiye olmuş adenokarsinomlarda bcl2 mRNA ekspresyonu normal dokuya oranla % 30 daha fazladır (43).

Hücre siklusu pozitif ve negatif düzenleyiciler tarafından kontrol edilir. Siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri, siklin ve CDK'nın çeşitli anormal ekspresyonları ve genetik değişimleri mide kanserinin patojenitesinde rol oynar. Siklin E'nin amplifikasyonu diffüz ve intestinal tip mide kanserlerinin % 10 ve % 20'sinde görülür (42). Mide kanserlilerin yaklaşık % 50'sinde siklin D1'in yüksek ekspresyonunun olduğu belirlenmiştir (46).

Normal hücrelerde telomeraz aktivitesi bulunmadığı için yaş ilerledikçe telomerlerin boyu kısalmaktadır. Yaşlanma ile birlikte kanser riskinde artış görülmektedir. Kanser dokularının birçoğunda ise telomerler kısa ve telomeraz aktivitesi yüksektir. Bu durum kanserle telomer ve telomeraz aktivitesi arasında bir ilişki olduğu hipotezini desteklemektedir. Mide karsinomlu dokuların birçoğu histolojik tipten bağımsız olarak yüksek telomeraz aktivitesi göstermektedir (44).

2.2.3.KOLOREKTAL KANSER

2.2.3.1. Epidemiyoloji ve Patoloji

Kolorektal kanser gelişmiş ülkelerdeki başlıca sağlık sorunlarından biridir. Kolorektal kanserler erkeklerde sık görülen kanserler arasında üçüncü, kadınlarda ise ikinci sırada yer almaktadır. Yine kolorektal kanser, kanserden ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada gelmektedir (50).

Kolorektal kanserler endüstriyel toplumlarda sık görülen tümörlerdir. Kolorektal kanserlerin %85 kadarı adenokanserdir. Yüzde 15 kadarı ise müsinöz adenokanserdir. Rektal kanserler erkeklerde kadınlara göre daha sık görülmektedir. Kolorektal kanser riski yaş arttıkça artmaktadır. Rektal kanserler için yaş medyanı 69, kolon kanserleri için 71'dir. Yaklaşık % 20 kadar olguda kalıtsal etkenler devreye girmektedir. Aile öyküsü kolon kanserlerinde daha ön planda yer almaktadır ve diyet gibi diğer risk etkenlerinden bağımsızdır. Ailesinde kolorektal kanser öyküsü olanlarda kanser görülme yaşı 55 yaşa kadar düşmektedir (51).

Kolorektal kanserin sınıflandırma, evrelendirme ve beş yıllık yaşam oranları çizelge 2.4 ve 2.5’de verilmiştir.

Çizelge 2.4: Kolorektal Kanserin patolojik TNM Sınıflaması (52)
(T: Tümör, N: Lenf nodu, M: Uzak metastaz)

Tümör Evresi (T)	Tanımlama
T_x	Kanıya varılamayan evredir.
T₀	Kansere ait belirti yoktur.
T_{is}	Karsinoma insitu
T₁	Tümör submukozadadır.
T₂	Tümör muscularis mukozaya geçmiştir.
T₃	Tümör subserozadadır ve/veya nonperitoneal perikolik, perirektal dokular tutulmuştur.
T₄	Tümör diğer organ veya dokuları tutmuştur veya peritonu delmiştir

Lenf Nodu Evresi (N)	Tanımlama
N_x	Bölgesel lenf nodları tutulumu ile ilgili olarak kanıya varılamamıştır.
N₀	Lenf nodu tutulumu yoktur.
N₁	1-3 perikolik veya perirektal lenf nodunda metastaz vardır.
N₂	4 ve üzeri perikolik veya perirektal lenf nodunda metastaz vardır.
N₃	Majör bir damarsal yapı ile birlikte herhangi bir lenf nodu tutulumu vardır.

Uzak Metastaz Evresi (M)	Tanımlama
M_x	Uzak metastaz varlığı ile ilgili olarak kanıya varılamamıştır.
M₀	Uzak metastaz yoktur.
M₁	Uzak metastaz vardır.

Çizelge 2.5: Kolorektal Kanserin Evrelendirmesi ve Beş Yıllık Yaşam Oranları (52)
(T: Tümör, N: Lenf nodu, M: Uzak metastaz)

Tümör Evresi	TNM sınıflaması	5 Yıllık Yaşam Oranı
I	T ₁₋₂ , N ₀ , M ₀	% 70-95
II	T ₃₋₄ , N ₀ , M ₀	% 54-65
III	T _{herhangi} , N ₁₋₃ , M ₀	%39-60
IV	T _{herhangi} , N _{herhangi} , M ₁	%0-16

2.2.3.2. Etiyoloji

Gastrointestinal kanserlerin oluşumunda rol alan özgül etiyolojik ve patojenik mekanizmalar oldukça karmaşık ve heterojendir. Gastrointestinal kanserler içinde en sık görüleni kolorektal kanserlerdir. Ailesinde kolorektal kanser öyküsü olan bireyler birinci derecede riske sahiptirler. Yine ailesel adenomatöz polipozis öyküsü olanlarda risk daha da yüksektir. Diğer risk etkenleri ise yüksek yaş, inflamatuvar barsak hastalığı, yağ ve hayvansal proteinlerden zengin diyet ve sedanter yaşam tarzıdır. Ayrıca kesin olmamakla beraber alkol ve sigara kullanımı, aspirin ve nonsteroid antiinflamatuvar ilaç kullanımı, selenyum ve kalsiyum içeren diyet gibi risk etkenleri üzerinde durulmuştur (28).

Kolorektal kanser etiyolojisindeki en önemli etken kolonik mukoza epitel hücrelerindeki genetik değişikliklerdir. Mutajen etkilere açık olmak, fekal mutajenler, fazla et tüketimi, safra asitleri, vitamin ve mineral tüketiminin değişmesi ve alkali fekal pH kolorektal kanser oluşumuna yatkınlığı artıran etkenlerdir (50).

Fiziksel aktivitedeki azlık kolorektal kanser açısından risk oluşturmaktadır. Özellikle sedanter yaşam tarzına sahip bireylerde yüksek yağ içerikli diyet riski artırmaktadır. Fiziksel aktivitenin az olması, barsak transit süresinde artışa, interlökin-1 düzeyinde azalmaya, sekonder/primer safra asit oranında artışa, prostaglandin F düzeyinde azalmaya, serum kolesterol düzeyinde artmaya, gastroenteropankreatik hormonların serum düzeylerinde azalmaya yol açarak kolondaki neoplastik değişikliklere neden olmaktadır (51).

Normal kolonik mukozada steroid hormon reseptörleri bulunmaktadır. Bu reseptörler kolorektal tümör hücrelerinde de bulunur. Bu reseptörlerin uyarılması

epiteliyal proliferasyonu artırmaktadır. Premenapozal kadınlarda aynı yaştaki erkeklere oranla kolon kanser sıklığı daha fazladır. Menapozal östrojen kullanımı ise kolon kanserine karşı koruyucu etki göstermektedir. Seks hormonlarının kolon kanseri ile olan ilişkisi safra asiti üretimini, barsak transit zamanını ve kolondaki bakteriyel fermentasyonu etkilemelerinden kaynaklanmaktadır (51).

Diyetin kanser gelişimindeki rolü tartışmalıdır ve bireysel özellikler bu ilişkide oldukça önem kazanmaktadır. Özellikle yüksek miktarlarda doymuş yağ tüketimi ve lifli gıdaların az tüketilmesi kolorektal kanserle ilişkili olarak bulunmuştur. Artmış vücut kitle indeksi, kalori alımının artışı, kırmızı et tüketimi, β -karoten ve kabak, brokoli gibi sebzelerin az yenilmesi yine riski artırmaktadır. Diyetle kolorektal kanser arasındaki ilişkinin derecesi özellikle erkeklerde kadınlara oranla daha yüksektir. Diyetle yüksek miktarda yağ bulunması feçeste yağ asiti ve serbest safra asit konsantrasyonunu artırarak, kolon mukozasında irritasyona ve epitelde onarım amaçlı proliferasyonun artışına yol açmaktadır. Antioksidan özellikleri olan vitamin C, E ve selenyumun antineoplastik etkileri bulunur. Askorbik asit ve vitamin E fekal mutajenlerin düzeyini azaltmaktadır (51).

Mutajenlerin ortaya çıkması ve genetik yapı arasında bir ilişki bulunur. Mutajenlerin detoksifikasyonunda sorumlu olan genlerdeki polimorfizmler nedeniyle metabolik yollarda değişiklikler meydana gelmektedir. Mutajenle indüklenen DNA hasarından korunmak için birçok detoksifiye edici enzim görev yapmaktadır. Örneğin glutatyon S-transferaz, DT-dioforaz ve N-asetiltransferaz bunlardan bazılarıdır. Diyetteki fazla pişmiş etlerde bulunan heterosiklik aminlerin detoksifikasyonunda rol alan N-asetiltransferaz enziminde meydana gelen bir polimorfizm kolorektal kanser gelişiminde rol oynamaktadır. Ayrıca bazı diyetler nedeniyle fekal mikroflora değişmekte ve ekstrasellüler süperoksit oluşumu sonucu fekal mutajenler ortaya çıkmaktadır. Fekal mutajenler arasında fekapentenler, 3-ketosteroidler ve heterosiklik aminler sayılabilir. Lifli gıdaların ve antioksidanların diyetle alınması ile fekal mutajenlerin etkileri azaltılabilmektedir. Diyetle yüksek oranda kırmızı et bulunması ve bu etlerin yüksek ısılarla pişirilmesi de kolorektal kanser riskini artırmaktadır (50).

Kolorektal kanser gelişimi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve proto-onkogenlerin aktivasyonunun beraberliği sonucu gelişmektedir. Oluşan gen

değişiklikleri delesyonlar, amplifikasyonlar ve tek nükleotid mutasyonları şeklindedir (51).

Kolorektal karsinoma için tümör baskılayıcı genler kromozom 5,14,17,18, ve 22 üzerinde yerleşmiştir ve kansere zemin hazırlayan gen değişiklikleri birden fazla lokusta izlenmektedir. Kolorektal kanserlerinde, ras nokta mutasyonlarına %40 oranında, c-myc ekspresyonunda artışa ise %73 oranında rastlanmaktadır. Yine bu özellikler metastatik tümörlerde de izlenmektedir. DCC (deleted in colorectal carcinoma) gen delesyonları, p53 mutasyonları da karsinomalarda sık izlenen moleküler genetik anormallikleridir. Ayrıca ailesel adenomatöz polipozis (FAP) genindeki delesyonlar da kanserle ilişkilidir. Genetik geçişli nonpolipozis kolorektal kanser tüm kolorektal kanserlerin %4-6'sının nedenidir. Pek çok olguda kromozom 2'de bir genetik defekt bulunur. Kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser dışındaki diğer kalıtsal kolon kanser sendromları ise herediter flat adenoma sendromu ve ailesel adenomatöz polipozistir(51).

Kalıtımsal kolorektal tümör sendromları incelendiğinde birçok gende defekt olduğu izlenmiştir. Bunlardan birisi kromozom 5q'da yer alan ve ailesel adenomatöz polipozis, Gardner ve Turcot sendromları ile ilgili olan, adenomatöz polipozis koli (APC) tümör baskılayıcı geninde meydana gelen mutasyonlardır. APC proteini hücre-hücre adezyonu, hücre migrasyonu veya apoptozisin düzenlenmesi ile ilişkilidir. Sporadik kolorektal tümörlerde ise yine en sık olarak APC mutasyonu izlenirken (%75-80), ayrıca k-ras onkogeninde (%45-50) ve p53 tümör baskılayıcı geninde (%60-70) de mutasyon olduğu bulunmuştur (28).

Kolorektal kanserlerde genetik risk etkenleri de önemlidir. Ailesel polipozis sendromları (ailesel adenomatöz polipozis, Peutz-Jeghers sendromu, gibi), otozomal dominant geçişli herediter nonpolipozis kolon kanseri, ailede polip ve kolon kanseri öyküsü olması ve inflamatuvar barsak hastalıkları (kronik ülseratif kolit, kronik granümatöz kolit) genetik risk etkenleri arasındadır. Bireyin medikal öyküsü de (örneğin geçirilmiş kolesistektomi ve üreterosigmoidostomi operasyonları, pelvik ışınlanma) önemlidir (50).

Kolonda adenoma gelişiminde sigara ve alkol kullanımı bağımsız risk etkenleri olarak kabul edilmektedir (51).

Primer safra asitlerinin günde yaklaşık %30 kadarı kolondan geçmektedir. Kolonda bu safra asitleri dehidroksile olarak sekonder safra asitleri meydana

gelmektedir. Sekonder safra asitleri olan deoksikolik asit ve litokolik asit kolon karsinogenezinde rol oynamaktadır. Diyetle fazla miktarda yağ alınırsa sekonder safra asiti atılımı yaklaşık iki kat kadar artmaktadır. Diğer yandan lifli gıdaların tüketimi ise intraluminal pH'ı azaltarak sekonder safra asiti oluşumunu azaltmaktadır (51).

Normal safra asitleri yağ sindiriminde rol alırlar ve neoplazi için risk oluşturan intestinal mukoza hiperproliferasiyonuna neden olurlar. Diyetteki yağ oranı ile orantılı olarak artan safra asitleri kolorektal kanser için risk oluştururlar. Etkilerini kolonik hücrelerde malin dönüşüme yol açan bir transkripsiyon faktörünü aktifleştirerek gösterirler. Alkali fekal pH'da safra asitlerinin ve karsinojenlerin çözünürlüğü bozulmakta ve intestinal mukoza hücrelerindeki DNA hasarlayıcı etkileri artmaktadır. (50). Obezite ve fiziksel aktivite azlığı da kolon tümörlerinin gelişiminde rol oynamaktadır. Kolorektal kanserler için diğer risk etkenlerinden biri de 50 yaş üzerinde olmaktır (50).

Peptik ülser hastalığı için yapılmış mide ameliyatları sonrasında da kolon kanseri riski artmaktadır. Gastrektomi geçiren hastalarda artan gastrin düzeylerinin kolon kanserinin büyümesini uyardığı düşünülmektedir. Serum gastrin yüksekliği ve kolonik adenoma ve kolon kanseri arasındaki ilişki bazı çalışmalarda belirtilmiştir (51).

Kolon kanserlerinin büyük çoğunluğunun adenoma zemininden geliştiğine dair pek çok çalışma bulunmaktadır. Adenomun kolondaki lokalizasyonu, boyutu ve villöz içeriği kanserle ilişkisinde önemlidir. İleri yaş ve birden çok polip varlığı da adenomaların displazi riski ile ilişkilidir (51).

2.2.4. PANKREAS KANSERİ

2.2.4.1. Epidemiyoloji ve Patoloji

Pankreas kanseri çözüme kavuşturulamamış sağlık sorunlarından biridir ve kanserden ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada gelmektedir. Tanısındaki güçlükler, pankreas kanserlerinin saldırgan niteliği ve etkili sistemik tedavilerin yetersizliği nedeniyle pankreas kanserli hastaların ancak %5'inde teşhisten sonraki sağ kalım 5 yıl kadardır (53). Pankreas kanserinin en sık görülen patolojik türü duktal adenokarsinomlardır. Ardından sırasıyla seröz/müsinöz kistadenokanserler ve intraduktal müsinöz papiller tümörler gelmektedir (54).

Pankreas kanserinin evrelendirmesi çizelge 2.6'da verilmiştir.

2.2.4.2. Etiyoloji

Pankreas kanseri patogenezinde diğer kanserlerde olduğu gibi pek çok etiyolojik etken üzerinde durulmaktadır. Bunların başında sigara kullanımı gelmektedir. Özellikle sigara içim süresi ve miktarı ile ilişkili olarak bu risk artmaktadır. Kesin olarak belirtilemese de kahve ve alkol içilmesi de etiyolojik etkenler arasında tartışılmaktadır. Uzun süredir diabetes mellitus hastası olan bireylerde de bu hastalığın pankreas kanseri gelişimine yol açan bir risk etkeni olabileceği belirtilmektedir. Kronik pankreatit ve pankreas kanseri ilişkisi üzerinde de durulmaktadır. Ailevi yatkınlığın ise %5-8 pankreas kanseri olgusunda rolü olabileceği belirtilmektedir. Endokrin ve ekzokrin pankreas kanserine yatkınlık yaratan kalıtsal hastalıklar arasında çoklu endokrin neoplazi tip I sendromu, kalıtsal pankreatit, kalıtsal nonpolipozis kolon kanseri/Lynch sendromu, von Hippel-Lindau sendromu, ataksi-telenjektazi vb. sayılabilir. Pankreatik karsinogenezde rolü olan gen mutasyonları da önemlidir. p16(CDKN2), BRCA2, ve STK11/LKB1 bunlardan bazılarıdır. Diğer ailevi gastrointestinal kanserlerden farklı olarak, örneğin kolon kanseri, pankreas kanserinde yaş, tümör histopatolojisi ve sağ kalım süresi sporadik kanserlerden farklı değildir (53).

Pankreas kanseri ile ilişkili olan genetik anormallikler önemlidir. K-ras onkogenindeki nokta mutasyonlarının %75–90 oranında pankreatik adenokanserlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Sinyal ileti sisteminde rolü olan ras onkogeninde meydana gelen bir mutasyon sonucunda ras proteini sürekli olarak aktif halde kalır ve kontrolsüz hücresel proliferasyon sinyallerine neden olur. K-ras mutasyonu pankreatik karsinogenezdeki tümör progresyonunda erken bir belirteç olarak önem taşımaktadır. Ras onkogenindeki mutasyon sonucu vasküler endotelial büyüme etkeni (VEGF) düzenlenmesinde artışı gözlenmektedir. VEGF solid tümörlerdeki anjiyogenez sürecinde önemlidir. Anjiyogenez ise tümörlerin 1 mm ve daha fazla büyümeleri, metastaz oluşturmaları için esansiyel bir olaydır. Ras mutasyonunun pankreas kanserindeki rolü hem tümör hücre proliferasyonunu tetiklemesi, hem de indirek olarak VEGF üzerinden anjiyogenezi uyarmasıdır. Yine ras ve src onkogenleri bir çok transkripsiyon faktörünü (AP-1, Rel/NF-kB gibi) aktive etmek suretiyle pankreas kanserindeki tümör invazyonu, anjiyogenez ve metastazla ilişkili olan genlerin düzenlenmesini artırır. Yine p53 ve p16 gibi tümör baskılayıcı genler de VEGF ekspresyonunu düzenlemekte rol alırlar (53).

Pankreas kanseri ile ilgili olan çeşitli delesyonlar üzerinde de çalışılmıştır. Bunlar DPC (deleted in pancreas cancer) 1/2, 3 ve 4'tür. DPC4 (smad4) bir tümör baskılayıcı genidir, TGF- β (transforming growth factor-beta) sinyalizasyon yollarında yer alır ve epitelyal hücre büyümesinin düzenlenmesini azaltır, apoptozisi tetikler. DPC4 pankreas kanserlerinin %30'unda homozigot olarak delesyona uğramıştır. P53 tümör baskılayıcı geni normal hücre işlevlerinde önemlidir ve insan kanserlerinde mutasyonu en çok bildirilmiş genidir. Pankreas kanserlerinin %70'inde p53 işlev kaybı vardır ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde p16 geninin inaktivasyon şeklindeki mutasyonu da retinoblastoma (Rb) proteininin hiperfosforile olması suretiyle hücre döngüsünün kontrolünün kaybına ve regüle edilemeyen hücre büyümesine neden olur. Sıklıkla malin melanoma ile ilişkilendirilen bu mutasyon pankreatik kansere yatkınlığa da neden olmaktadır (53).

Çizelge 2.6: Pankreas Kanserinin Evrelendirmesi (54)

(T: Tümör, N: Lenf nodu, M: Uzak metastaz)

Tümör Evresi	TNM Sınıflaması	Tanımlama
I	T ₁₋₂ , N ₀ , M ₀	Tümör pankreasla sınırlıdır.
II	T ₃ , N ₀ , M ₀	Tümör duodenum, safra kanalına invazedir, lenf nodu tutulumu yoktur.
III	T ₁₋₂₋₃ , N ₁ , M ₀	Tümör duodenum, safra kanalından ileriye gitmemiştir, lenf nodu tutulumu bulunur.
IVA	T ₄ , N _{herhangi} , M ₀	Tümör lokal olarak büyüyerek kan damarları, mide, dalak, kolona ulaşır. Lenf nodu tutulumu vardır veya yoktur.
IVB	T _{herhangi} , N _{herhangi} , M ₁	Karaciğer ve akciğer gibi uzak organ metastazı vardır.

2.3. KANSER VE SİNYAL İLETİMİ

Karsinogenezin temelinde hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve farklılaşma gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır. Kanserin gelişimi sürecinde tümör hücreleri birçok malign fenotipik özellikler kazanır. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız

çoğalmalarına ve çevre dokuya yayılmalarına neden olur. Ayrıca, bu hücreler özgün mikroçevreden bağımsız olarak yaşamını devam ettirme ve metastaz yapma özelliğine sahiptir. Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seri mutasyonları farklı mekanizmalar aracılığıyla malign fenotipin oluşumuna katkıda bulunur (22,55).

Sinyal ileti yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkojenik mutasyonlara sık rastlanmaktadır. Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylelikle, onkojenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/ metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır (22).

2.4. SİNYAL İLETİMİ

Sinyal transdüksiyon yolları olarak da bilinen çeşitli sinyal iletim mekanizmalarında sinyal terimi reseptör aktivasyonunu, transdüksiyon ise bir uyarının yanıtı dönüşmesindeki süreci anlatmaktadır (56). Sinyal oluşumunda reseptör adı verilen özgül proteinlere ihtiyaç vardır. Reseptörler sinyal molekülünü geri dönüşümlü olarak bağlar ve hedef hücrede bir yanıt oluştururlar. Pek çok durumda bu reseptörler hedef hücre yüzeyinde bulunan transmembran proteinleridir. Ligand yani ekstrasellüler sinyal molekülü bağlandığında aktive olurlar. Hücrenin karakterine göre intrasellüler sinyal kaskadını başlatırlar. Bazı durumlarda ise reseptörler hücrenin içindedir ve sinyal molekülü reseptörü aktive etmek için hücre içine girer. Bu sinyal molekülleri küçük ve hidrofobik yapıda olduklarından plazma membranından difüze olabilirler (57).

Sinyal transdüksiyon sistemlerinin ortak özellikleri özgüllük, amplifikasyon, desensitizasyon ve integrasyondur. Reseptör ligandı yüksek derecede özgüllük ve duyarlılıkla bağlamaktadır. Reseptör etki mekanizmalarında çoğunlukla enzim aktivasyonu olmaktadır. Özellikle protein kinaz aktivasyonu ile ilerleyen mekanizmalarda sinyal amplifikasyonu olmakta ve bu şekilde hücrenin liganda duyarlılığı artmaktadır. Eğer uyarıcı molekül dolaşımında uzun süre yüksek düzeyde kalırsa hücre reseptörlerini inaktifleştirerek, sayılarını azaltarak veya hücre yüzeyinden uzaklaştırarak ligand etkisine yanıtızsız kalmaktadır. Sinyal transdüksiyon mekanizmaları arasında haberleşme ve etkileşim bulunmaktadır. Bu sayede hücre uyarıları bütünleştirerek yanıtını oluşturmaktadır (57).

Sinyalizasyonda genel olarak beş temel mekanizma bulunur (58):

- 1) Lipidde çözünebilen ligand membranı geçip intrasellüler reseptöre bağlanarak etki gösterir.
- 2) Transmembran reseptör proteininin ekstrasellüler bölgesine ligand bağlandığında intrasellüler bölgede enzimatik aktivite olur. Reseptörün kendisi enzim gibi davranır. Reseptörde intrinsek enzim aktivitesi vardır.
- 3) Ligand yine transmembran reseptörünün ekstrasellüler kısmına bağlanır ve bağımsız bir protein tirozin kinazı aktive eder. Örneğin Jak kinaz. Burada reseptörün intrinsek kinaz aktivitesi yoktur.
- 4) Ligand veya iyon bağımlı transmembran kanalı ligandın bağlanması ile açılıp kapanabilir.
- 5) Transmembran reseptör proteinine ligand bağlandığında G-protein stimule olur ve intrasellüler ikincil haberciler yolu ile sinyal oluşur.

Reseptör aracılı sinyal iletimi aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir (56,58,59,60,61,62):

A) Hücre içi reseptörler (Gen transkripsiyonunu regüle eden nükleer reseptörler)

B) Hücre yüzey reseptörleri:

a) İyon kanalı bağımlı reseptörler (iyonotropik reseptör)

- Voltaj bağımlı
- Ligand bağımlı

b) Enzim bağımlı (kinaz bağımlı) reseptörler

- Reseptör guanilil siklaz
- Reseptör tirozin kinaz
- Tirozin kinazla ilişkili reseptörler (reseptör dışı protein tirozin kinaz)
- Reseptör tirozin fosfataz
- Reseptör serin / threonin kinaz
- Reseptör serin / threonin fosfataz

- c) G-protein bağı reseptörler (metabotropik reseptör) ve ikincil haberciler
- c AMP yolu
 - Fosfolipaz C ve inozitol fosfat yolu
 - Ca^{++} - Kalmodulin yolu
 - c GMP yolu
 - İyon kanalı düzenlenmesi
 - Fosfolipaz A_2 yolu

2.5. GTP/GDP BAĞLAYICI PROTEİNLER (G PROTEİNLERİ)

GTP/GDP bağlayıcı ve düzenleyici proteinler olan G-proteinleri hücre yüzey reseptörlerinden gelen eksternal sinyallerin hücre içi moleküllere iletiminde rol alırlar (Şekil 2.1). Bilginin plazma membranından transferi yaşayan hücrelerdeki genel bir özelliktir (63). Pek çok hormon, nörotransmitter, kemokin ve yerel araçlar sinyal iletimini G-protein bağı reseptörlere bağlanarak gösterirler (4).

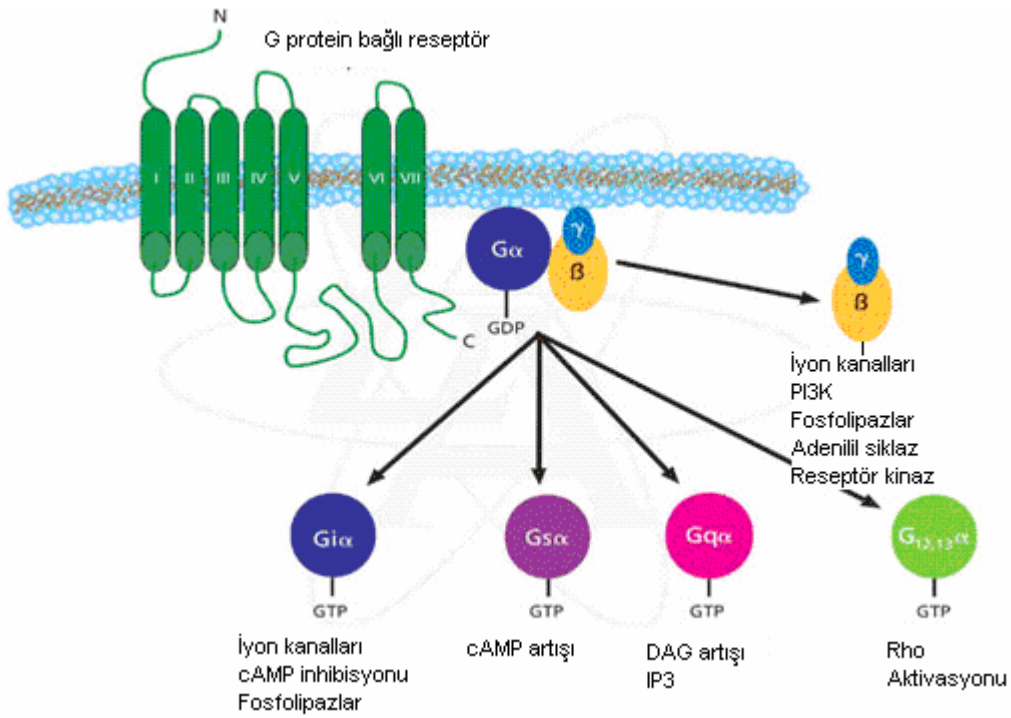
G-proteinlerinin biyolojik etkileri arasında, koku ve tat alma, görme, nörotransmitter işlevi, endokrin ve ekzokrin bez işlevleri, kemotaksis, ekzositoz, kan basıncının kontrolü, embriyogenez, hücre büyüme ve farklılaşması, onkogenез ve enfeksiyonlar sayılabilmektedir (64).

G-protein bağı reseptörler ilk kez 1986 yılında beta-adrenoreseptör olarak tanımlanmıştır (62). 1994 yılında ise Alfred G. Gilman ve Martin Rodbell G-proteinlerini ve bu proteinlerin hücre sinyal iletimindeki rollerini açıklamaları nedeniyle fizyoloji/tıp alanında Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir.

Pek çok ekstraselüller ligand, cAMP, Ca^{++} iyonu ve fosfoinozitollerin intraselüller konsantrasyonlarını arttırarak etki gösterir. Bu işi ise genellikle üç farklı komponentten oluşan bir transmembran sinyal iletimi aracılığı ile saniyeler içinde yaparlar. Sinyal iletimi sırasıyla şu şekilde gerçekleşir (58):

- Ekstraselüller ligand hücre yüzey reseptörü tarafından algılanır.
- Reseptör plazma membranının sitoplazmik yüzeyinde yerleşik olan G-proteininin (GDP/GTP bağlayıcı regülör proteinler) aktivasyonunu tetikler.

- Aktive olan G-proteini ise genellikle bir enzim veya iyon kanalı olan efektör elemanın aktivitesini değiştirir. Bu efektör eleman ise intraselüler ikincil habercinin konsantrasyonunu değiştirir. Böylece;
 - a) Adenilil siklaz/cAMP sisteminin uyarılması
 - b) Fosfolipaz C/inozitol fosfat sisteminin uyarılması
 - c) Guanilil siklaz/cGMP sisteminin uyarılması
 - d) Ca^{++} kalmodulin yolunun aktive olması ya da
 - e) İyon kanallarının düzenlenmesi gerçekleşir (62).



Şekil 2.1: G protein bağlı reseptör ve heterotrimerik G protein alt birimleri (65)

G-protein ve ikincil haberci yolunu kullanan endojen ligandlar ve bunlara ait ikincil habercilere örnek olarak şunlar verilebilir (57):

- İkincil habercisi cAMP olanlar; adrenokortikotropik hormon, katekolaminler (beta), koryonikgonadotropin, FSH, LH, Glukagon, histamin, MSH, PTH, prostoglandin E2, prostasiklin, serotonin (5-HT4), tirotropin, vasopressindir (V2).
- İkinci haberci olarak Ca⁺⁺ fosfoinozitleri kullanan ligandlar ise; Asetilkolin (muskarinik), anjiotensin, katekolamin (α 1), PDGF, serotonin (5-HT1c ve 2), TRH, vasopressindir (V1).
- cGMP'yi kullananlara örnek olarak ise atriyal natriüretik faktör (ANF), nitrik oksit (NO) verilebilir.

G-protein süper ailesinin birçok üyesi bulunmaktadır (4,66):

A) Heterotrimerik G-proteinleri:

Heterotrimerik G-proteinleri α , β , ve γ alt birimlerinden oluşan proteinlerdir.

B) Küçük (small) G-proteinleri:

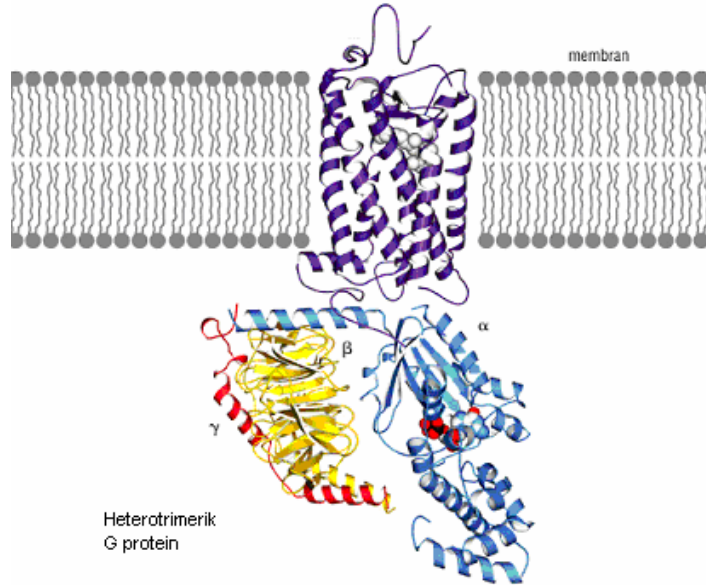
Ökaryotlarda yüzden fazla üyesi tanımlanan küçük G-proteinleri 20–40 kDa molekül ağırlığına sahip monomerik proteinlerdir. Düşük molekül ağırlıkları nedeniyle bu adı almışlardır. Tüm G-protein ailesinde olduğu gibi GTP/ GDP bağlayıcı ve GTPaz aktiviteleri bulunur. GTP bağlı iken aktif, GDP bağlı iken inaktif durumdadırlar. Guanin nükleotidlere bağlanma ve hidrolizi sırasında proteinin G katalitik bölgesindeki I ve II. anahtar bölgelerinde belirgin yapısal değişiklik meydana gelir. Heterotrimerik G-proteinlerinde yer alan ve alfa alt biriminde olan III. anahtar bölgesi küçük G-proteinlerinde yoktur. Ras, Rho/Rac, Rab, Sar-1/Arf ve Ran olmak üzere beş alt ailesi tanımlanmıştır. Bunlar pek çok hücrel işlevi düzenlemektedirler. Örneğin; Ras proteinleri gen ekspresyonunu, Rho/Rac proteinleri hücre iskeletinin reorganizasyonunu, gen ekspresyonunu ve düz kas kasılmasını düzenler. Rab ve Sar-1/Arf proteinleri hücre içi vesiküler trafiği, Ran proteinleri ise nükleositoplazmik transportu düzenlemektedir. Bu proteinler fizyolojik işlevlerinin yanı sıra kanser, hipertansiyon, diabetes mellitus ve koroner vazospazm gibi çeşitli hastalıkların patogenezinde de rol oynamaktadırlar (67,68,69).

C) Translasyon elongasyon etkenleri :

Elongasyon etkenleri protein sentezi, mitotik aparat organizasyonu, sinyal iletimi, büyümenin düzenlenmesi, yaşlanma ve transformasyonda rol alırlar. Enerjilerini GTP veya ATP'den sağlarlar. EF-1, EF-2 ve EF-3 şeklinde alt grupları bulunmaktadır. EF-3 ökaryotlarda mevcut değildir. EF-1, aminoasit tRNA'ları ribozomun A bölgesine taşıırken, EF-2 ise ribozomda peptid bağı oluşumundan sonra peptidil t-RNA'nın P bölgesine translokasyonundan sorumludur (70,71).

2.5.1. HETEROTRİMERİK G PROTEİNLERİNİN YAPISI

G-protein süper ailesi üyelerinden olan heterotrimerik G-proteinleri α , β , ve γ subünitlerinden oluşan proteinlerdir. G-protein aracılı sinyal yollarının karmaşıklığı ve özgüllüğü G-proteinlerinin pek çok farklı alt birimden oluşmasından kaynaklanmaktadır (Şekil 2.2). Aynı nörotransmitter farklı G-protein bağı reseptörler üzerinden farklı etkiler gösterebilmektedir. Örneğin, insanda oniki adet serotonin, on adet adrenerjik reseptör bulunmaktadır. Aynı nörotransmitter tek bir G-protein bağı reseptör ile farklı G-protein alt birimleri üzerinden farklı etkiler gösterebilmektedir. Örneğin, G-protein yapısındaki α ve $\beta\gamma$ alt birimleri farklı efektörleri uyarmaktadırlar. Yine bir nörotransmitter tek bir G-protein bağı reseptör ile farklı G-proteinleri de aktive edebilmektedir. Örneğin Gq, Gs gibi (72,73).



Şekil 2.2: Heterotrimerik G proteini (74)

Küçük G-proteinlerinde olduğu gibi fizyolojik kovalent modifikasyonlar heterotrimerik G-proteinlerinin de işlevlerinde önemlidir. Tüm α ve γ alt birimleri lipid modifikasyonları taşımaktadırlar. α alt biriminde amino terminalde miristoilizasyon ve/veya palmitoizasyon şeklinde lipid modifikasyonları izlenmektedir. γ alt biriminde ise karboksi terminalden kovalent olarak bağlanan izoprenil grup (farnezil, geranil-geranil şeklinde) ile modifikasyon olmaktadır. Gamma alt birimindeki prenilasyon geri dönüşümlü iken, α alt birimindeki ise proteinin ömrünün sonuna kadar kalıcıdır. Bu lipid modifikasyonları α alt biriminin protein-protein ve protein-membran ilişkilerinde önemli iken, γ alt birimindeki izoprenoid modifikasyon $\beta\mu$ kompleksinin membranla ilişkisinde önemlidir (73,75). Bu modifikasyonlar kanser tedavisinde kullanılabilen çeşitli ilaçlar için de hedef oluşturmaktadır (75).

G-proteinleri hücrel fizyolojideki rollerini membrana bağlı sinyalizasyon komponentinin bir parçası olarak gösterirler. Fakat şimdi bilinmektedir ki, plazma membranı dışında G-proteinleri farklı hücrel lokalizasyonlarda da yer almaktadırlar. Örneğin, golgi aparatı, endoplazmik retikulum, nükleus gibi (76). Hormonal uyarıyı takiben G-proteinleri çeşitli bölgelere transloke olmaktadır. Örneğin; hücre iskeletinin yeniden organizasyonunda rol alırlar. Küçük G-proteinleri de nükleusta önemli roller üstlenirler (76).

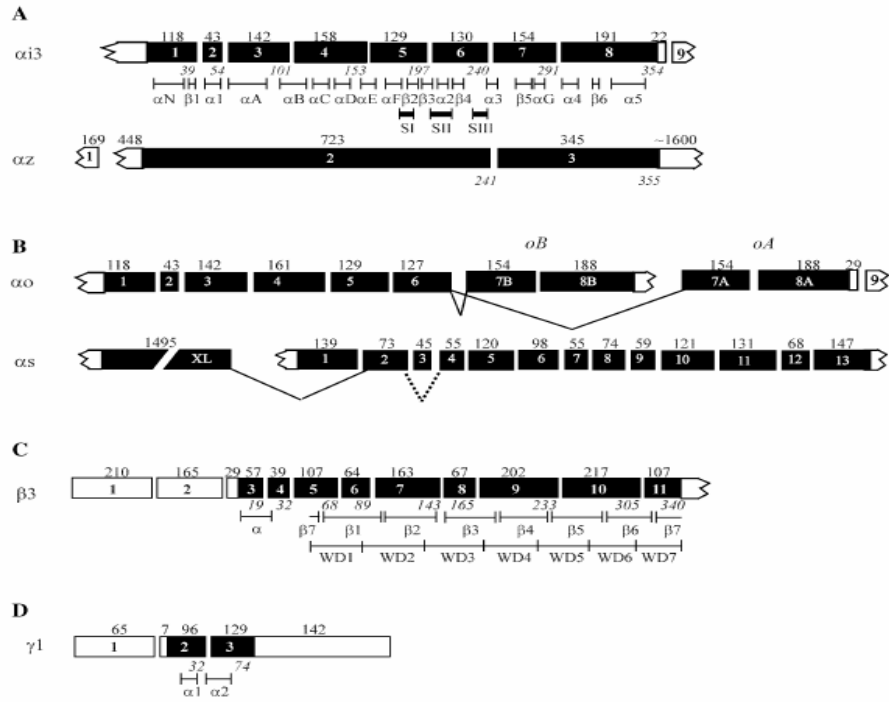
2.5.1.1. Heterotrimerik G-proteinlerinin alfa alt birimi:

Alfa (α) alt biriminde boyutlar 39–52 kDa arasında değişmektedir. G-proteinlerinin α alt birimi 16 gen ile kodlanmaktadır Bilinen 16 memeli alfa alt birimi aminoasit dizilerinin karşılaştırılması ile 4 alt aileye ayrılmıştır (Çizelge 2.7) (4,5,73).

Çizelge 2.7: G-protein alfa alt birimlerini kodlayan genler (73)

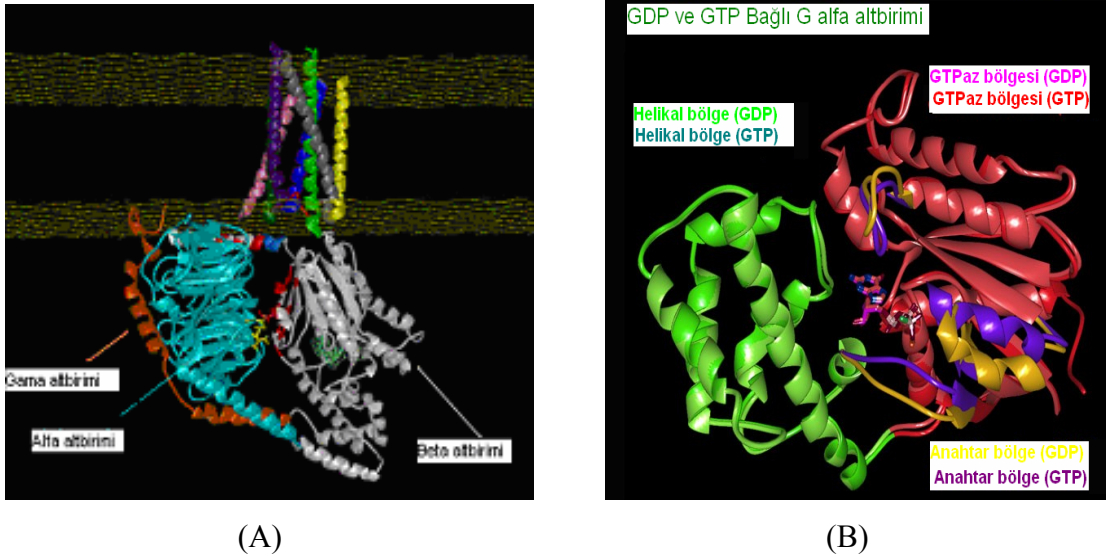
İSİM	GEN
Alfa alt birimi	
Gαs sınıfı	
G α_s	<i>Gnas</i>
G α_{sXL}	<i>Gnasxl</i>
G α_{sIF}	<i>Gnal</i>
Gαi/o sınıfı	
G α_{i1}	<i>Gnai1</i>
G α_{i2}	<i>Gnai2</i>
G α_{i3}	<i>Gnai3</i>
G α_o	<i>Gnao</i>
G α_z	<i>Gnaz</i>
G α_{guat}	<i>Gnag</i>
G α_{t-r}	<i>Gnat1</i>
G α_{t-c}	<i>Gnat2</i>
Gαq/11 sınıfı	
G α_q	<i>Gnaq</i>
G α_{11}	<i>Gnal1</i>
G α_{14}	<i>Gnal4</i>
G $\alpha_{15/16}$	<i>Gnal5</i>
Gα12/13 sınıfı	
G α_{12}	<i>Gnal2</i>
G α_{13}	<i>Gnal3</i>

G α s alt birim geni 14 ekzondan oluşurken, G α i/o ise 8 ekzondan meydana gelmektedir (4,5,73) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: G-protein alt birimlerini kodlayan gen yapıları (5)

$G\alpha$ alt birimi yapısal olarak iki bölümden oluşur. Bunlardan birincisi GDP/GTP'nin bağlanma ve GTP hidrolizinde rol alan GTPaz yani katalitik kısımdır. Bu bölüm yapısal olarak küçük G-proteinleri ve elongasyon etkenlerini kapsayan süperaileye identiktir. Bu kısımda guanin nükleotid bağlayıcı bir cep, Mg^{++} bağlayıcı bölüm, guanin halkası bağlayıcı motif ve GTP hidrolizi için gereken treonin ve glutamin birimleri yer alır. $G\alpha$ alt birimindeki Mg^{++} varlığı bu ünitenin GTP bağlayabilmesi için zorunludur. İkincisi ise helikal bölümdür, GTP'yi proteinin merkezine bağlamaktadır ve işlevi tam olarak bilinmemektedir. $G\alpha$ alt biriminde bir de lipid modifikasyonunun gerçekleştiği N-terminal heliks bulunur. Membranla olan etkileşimi için G-proteini lipidlere kovalent olarak bağlı durumdadır. $G\alpha$ alt biriminde üç adet anahtar (switch) bölge vardır. Bunlar GTP/GDP bağlanması sırasında konformasyonel değişikliğe uğramaktadırlar. G-protein ve GTP'nin γ fosfatı arasındaki yeni hidrojen bağları oluşumu ile konformasyonel değişiklik meydana gelmektedir. Bu bölgeler efektör bağlamada önemlidir. Anahtar I ve II bölgesi β alt birimi ile ilişki halindedir (Şekil 2.4) (4,5,73).



Şekil 2.4: Heterotrimerik G proteini yapısı

A: Alfa, beta ve gamma alt birimlerinin yapıları (77), B: Alfa alt biriminin yapısı (78)

2.5.1.2. Heterotrimerik G-proteinlerinin beta-gama alt birimi:

Beta (β) ve gamma (γ) alt birimleri ise dimer şeklinde birlikte işlevsel bir ünite oluşturmaktadır ve denatürasyon dışında birbirlerinden ayrılmazlar. Bu iki alt birim yalnızca kompleks halinde işlev gösterirler (4,79). G_γ alt birimi tüm etkileşimlerini G_β alt birimine bağlı iken gerçekleştirmektedir, tek başına etki göstermemektedir (Şekil 2.5) (79).

Beta (β) alt biriminin boyutu 36 kDa kadardır (5). N-terminal bölge ve uçak pervanesine benzeyen yedi tabakalı bir yapıdan oluşmuştur. Bir hipoteze göre bu yedi tabakalı pervane yapısının amacı protein üzerinde farklı farklı hedef ligandlarla ilişkiyi sağlayacak yedi farklı bölgeye olanak tanımasıdır (80). Bu tabakalı yapıya 40 adet aminoasitten oluşması nedeniyle WD 40 tekrarları adı da verilmektedir. WD motifi (WD tekrar dizi motifi) bir takım düzenleyici protein ve enzimlerde yer almaktadır. Genellikle sinyal iletiminde görevli proteinlerin yapısında bulunmaktadır. Bu proteinler, transkripsiyonu, hücre iskeletini, veziküler oluşum ve trafiği düzenleyen, hücre bölünmesini kontrol eden proteinler gibidir (80,81). Genel formu: $X_{6-94} - (GH-X_{23-41} - WD)$ şeklindedir. Bu form, bir değişken N-terminal yapıyı takiben bir ucuna GH yani Gly-His (glisin-histidin), diğer ucuna WD yani Trp-Asp (Triptofan-Aspartat) bağlanmış, göreceli olarak sabit uzunlukta bir çekirdek yapıdan oluşmaktadır (80). Her bir tabakada (pervane yaprağında) dört iplikçikli anti-paralel β tabakası (β -strand) bulunmaktadır (79,80). Üç iplikçik birinci pervane yaprağında yer alırken, dördüncü iplikçik bir diğer pervane yaprağında bulunmaktadır. Bu şekildeki üst üste binen yapılanma pervane yapraklarının sağlamlığında önem taşımaktadır (81). Yedinci pervane yaprağının ilk üç iplikçiği, G_β yapısında karboksi terminal (C-terminal) kısımda yer alırken, dördüncü iplikçik aminoterminalde (N-terminal) yer almaktadır (79). İkinci WD tekrar tabakası G_α alt biriminin anahtar bölgesi ile etkileşmektedir. G_β yapısı G_γ yapısına sıkıca bağlanırken, bir yandan da aynı anda onbeşten fazla farklı proteinle etkileşime girebilmektedir (81).

Gamma alt birimi betaya göre daha heterojen bir yapıdadır. Boyutları 7–8 kDa kadardır. G_γ alt biriminin C-terminal kısmı 5–6–7. pervane yapraklarının hizasında yerleşmiştir. N-terminal kuyruk ise coiled-coil heliks etkileşimi ile β alt birimine (N-terminal) bağlanmaktadır. C-terminal bölgede ise lipid modifikasyonları meydana gelmektedir (79).

β -alt birimi 5, γ alt birimi ise 12 gen ile kodlanır (5,73) (Çizelge 2.8). Beta alt birimini kodlayan genler 11 ekzondan meydana gelmiştir. β -alt biriminin toplam 5 adet alt tipi vardır ve bunlar aminoasit homolojisine göre β_{1-4} ve β_5 şeklinde iki alt aileye ayrılmaktadır. γ -alt birimini kodlayan genler, dört ekzondan oluşan γ_5 dışında, üç ekzondan oluşmaktadır. C-terminaldeki homolojiye göre γ_c-11 ; $\gamma_{2,3,4}$; $\gamma_{5,8,10}$ ve γ_{7-12} şeklinde dört alt aileye ayrılmış olan γ -alt biriminde 12 adet γ alt tip bulunur (5,64,73).



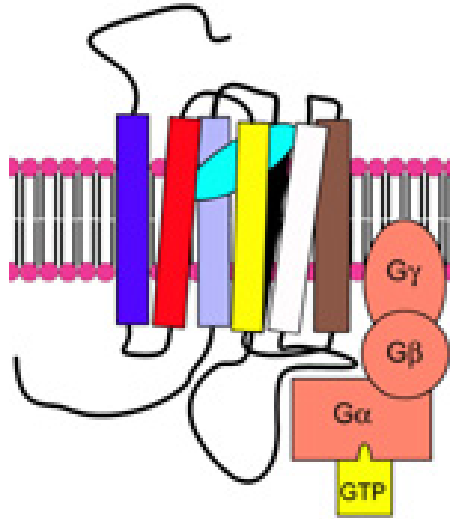
Şekil 2.5: Beta- gamma alt birimlerinin yapısı (82)

Çizelge 2.8: G-protein beta ve gama alt birimlerini kodlayan genler (73)

İSİM	GEN
Beta Alt birimi	
β	<i>Gnb1</i>
β_2	<i>Gnb2</i>
β_3	<i>Gnb3</i>
β_4	(<i>Gnb4</i>)
β_5	<i>Gnb5</i>
Gama Alt birimi	
γ_1, γ_{rod}	<i>Gng1</i>
$\gamma_{14}, \gamma_{cone}$	<i>Gng12</i>
γ_2, γ_6	<i>Gng2</i>
γ_3	<i>Gng3</i>
γ_4	<i>Gng4</i>
γ_5	<i>Gng5</i>
γ_7	<i>Gng7</i>
γ_8, γ_9	<i>Gng8</i>
γ_{10}	<i>Gng10</i>
γ_{11}	<i>Gng11</i>
γ_{12}	<i>Gng12</i>
γ_{13}	<i>Gng13</i>

2.5.1.3. G-protein Bağlı Reseptörler

G-protein bağlı reseptörler (GPCR: G-protein coupled receptors), binden fazla üyesi olan belirgin bir yapısal motife sahip iyi bilinen bir ailedir (64). G-protein bağlı reseptörlere membranı yedi kez geçen bölgelere sahip olması nedeniyle 7-transmembran geçişli veya metabotropik reseptörler veya heptahelikal reseptörler adı verilmektedir. (Şekil 2.6) Bu reseptörler serpentin reseptörleri olarak bilinen bir aileye mensupturlar. İnsan genomundaki 10^5 genden 10^3 'ü bu reseptörleri kodlamaktadır. Adrenerjik amin, serotonin, asetilkolin, pek çok peptid hormonu ve visüel reseptörlerin tümü bu aileye dahildir (58). Bu reseptörlerin amino terminal grubu ekstraselüller yerleşimli iken karboksi terminal kısımları intraselüller yerleşir. Bu terminaller membranı yedi kez geçen bir transmembran polipeptid zincirle birleşirler. Transmembran bölgelerde 20–28 hidrofobik aminoasit yer almaktadır (62).



Şekil 2.6: G protein bağlı reseptör yapısı (83)

Eksternal uyarılar yani nörotransmitterler, hormonlar, fosfolipidler, fotonlar, büyüme etkenleri vb. gibi pek çok molekül bu reseptör ailesinin özgül üyelerini uyarmaktadır. Böylelikle membranın intrasellüler kısmında reseptör ve G-protein etkileşimi olmaktadır (64). Ekstraselüller kısımda agonist reseptör ile etkileşime girdiğinde reseptörde bir konformasyonel değişiklik olur ve G-protein reseptörün

sitoplazmik bölgesine bağlanır. G-proteininin tam olarak reseptöre bağlandığı yer reseptörün beş ve altıncı transmembran bölgeleri arasındaki üçüncü sitoplazmik ilmiğidir. Reseptörün sitoplazmik terminal kuyruğu çeşitli sayıda serin-threonin birimleri içerir. Bunların hidroksil grupları fosforile olabilmektedir. Bu fosforilasyon ise reseptör-G-protein bağlanması ile gerçekleşmektedir (58,59,62).

Yapısal ve sınırlı da olsa dizi benzerliklerine göre G-protein bağlı reseptörler üç gruba ayrılır (Şekil 2.7) (72,84):

I) Grup A reseptörler:

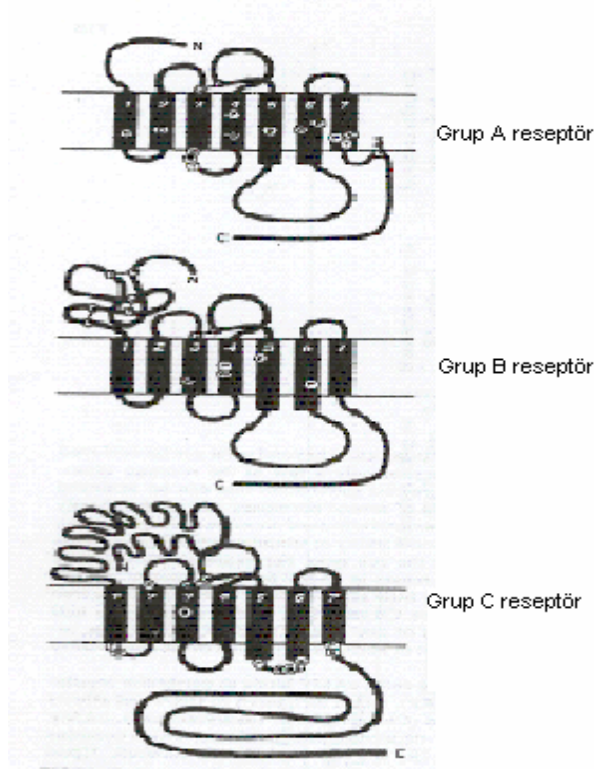
Rodopsin tipi reseptörlerdir. Klasik nörotransmitterler, prostaglandinler, geniş bir grup peptid ve nöropeptide ait reseptörlerdir. Diğer grup reseptörlerden bazı farklarla ayrılmaktadır. İkinci ve üçüncü ekstrasellüler ilmikler arasında bir disülfid köprüsü vardır. Karboksi terminal uca palmitoillenmiş bir sistein vardır ve bu dördüncü intrasellüler ilmiği oluşturmaktadır. Üçüncü intrasellüler ilmikte ise DRY şeklinde bir motif bulunur (72,84).

II) Grup B reseptörler:

Bu tip reseptörler sekretin/glukagon reseptörleridir. Kalsiyum, glukagon, parathormon, sekretin, vazopresin gibi hormonlar için reseptörlerdir. Yapısal özellikleri bakımından amino terminal grubu A tipi reseptörlerden uzundur ve aralarında disülfid köprüleri oluşturan pek çok sistein aminoasitinden oluşur. Grup A reseptörlere benzer şekilde ekstrasellüler ilmikler arasında da disülfid köprüsü bulunur, fakat burada palmitoillenmiş uç yoktur. Yapısındaki prolin aminoasitleri de A grubundakinden farklıdır (72,84).

III) Grup C reseptörler:

Metabotropik glutamat reseptörleridir. Glutamat, GABA, Ca⁺⁺ iyonları içindir. Yaklaşık 600 aminoasitlik uzun bir aminoterminal uç vardır. Aminoterminal uç ligand bağlayıcı bölgeyi de kapsamaktadır. Sadece bir adet disülfid köprüsü vardır. Çok kısa ve oldukça korumalı bir üçüncü intrasellüler ilmik bulunur (72,84).



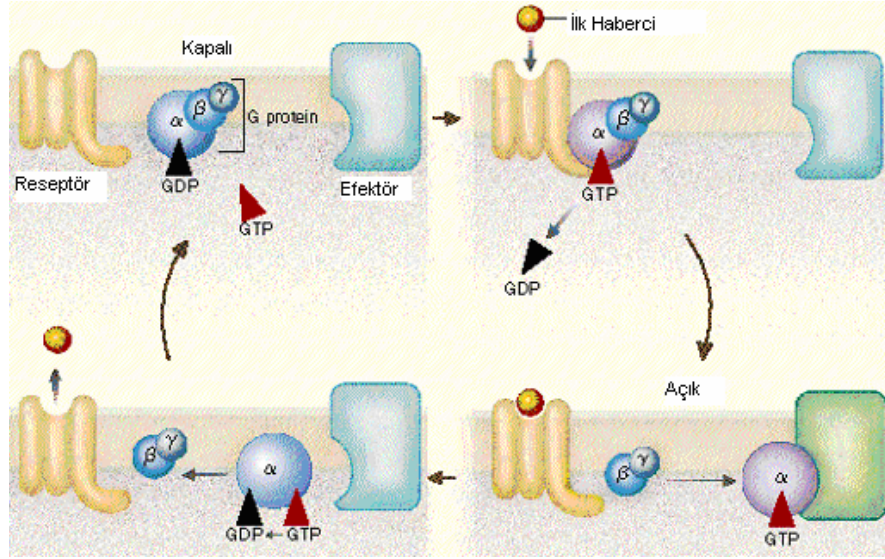
Şekil 2.7: G-protein bağlı reseptör tipleri (84)

2.5.1.4. G-proteinlerinin Moleküler Mekanizması

Gs ve diğer G-proteinleri GTP'ye bağlanma ve onun hidrolizini içeren bir moleküler mekanizma kullanırlar. G-protein α , β ve γ alt birimlerinden oluşur. Bunlar lipit kısımları (prenil grup) ile membrana bağlıdır. Guanin nükleotidleri α alt birimine bağlanır. Bu alt birimde GTP/GDP katalizini sağlayan enzimatik bir aktivite bulunur. Reseptör agonist ile bağlanınca G-proteinin dinlenme anında trimer şeklinde bulunan alt birimleri α ve $\beta\gamma$ olarak ayrılırlar. Reseptörde yapısal bir değişiklik oluşur ve G-proteinin α alt birimi reseptöre bağlanır. GDP bağlı olan α alt biriminden GDP ayrılır ve proteinin nükleotid bağlayıcı kısmına GTP bağlanır. Sonuçta α -GTP kompleksi oluşur. Bu kompleks ise reseptörden ayrılarak hedef proteini ile etkileşime girer. G-proteininin GTP bağlı hali efektör bir enzimin veya iyon kanalının aktivitesini düzenlemektedir (Şekil 2.8) (4,58,59,62,63).

G α alt birimine GTP bağlanması yapıda özellikle anahtar bölgelerde konformasyonel bir değişikliğe neden olarak $\beta\gamma$ dimerine bağlanma afinitesini

azaltmaktadır (4). $\beta\gamma$ alt birimi yapıdan ayrılınca α alt birimine benzer şekilde diğer bir hedef protein (efektör) ile etkileşime girer. Hedef proteine bağlandığında α alt biriminin GTPaz aktivitesi artar ve GTP/GDP hidrolizi ile sinyal sona erer. Sistem bazal şartlardaki trimerik yapısına geri döner ve heterotrimerik G-protein-GDP kompleksi yeni bir aktivasyon için hazırlanır (4,58,59,62,63).



Şekil 2.8: Heterotrimerik G protein etki mekanizması (85)

G-proteinleri GDP bağlı iken heterotrimerik durumda ve inaktif formdadır. Reseptör katalizli guanin nükleotid değişimi ile α alt birime GTP bağlanır ve aktivasyon olayı gerçekleşir. GTP bağlanmasının ardından GTP-G α alt birimi G $\beta\gamma$ alt biriminden ayrılır. Bu şekilde hem G α -GTP kompleksi, hem de G $\beta\gamma$ alt birimi ayrı ayrı molekülleri aktifleştirerek sinyalizasyonda görev alabilirler. Sinyalizasyon mekanizmasının sonlanması G-protein deaktivasyonu ile yani G α alt birimindeki GTP'nin GDP'ye hidrolizi ile gerçekleşir (4).

2.5.2. G-proteinlerinin İşlevleri

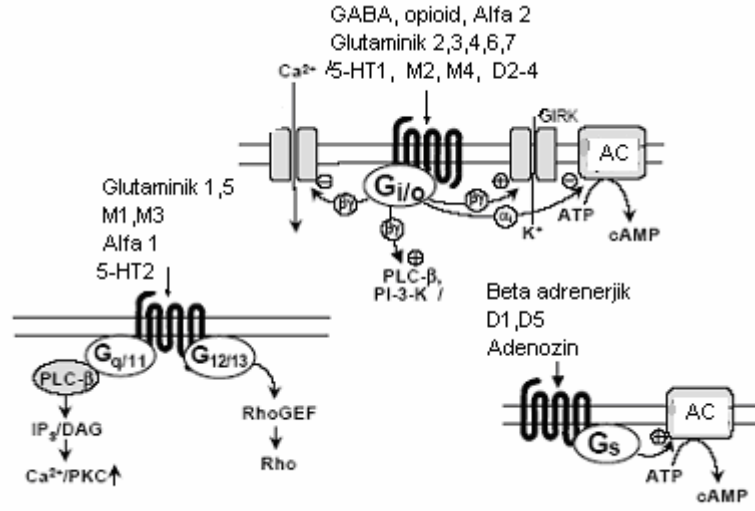
G-protein bağlı reseptörler, değişik ligandlarla uyarılmalarının ardından, sinyal iletimindeki rollerini G-proteinleri aracılığıyla yürütürler. G-proteinlerinin alt birimlerinin her biri ise farklı işlev ve özgünlüğe sahiptirler. Bu nedenle heterotrimerik G-proteinlerinin işlevleri oldukça geniş bir çeşitlilik göstermektedir (63). G-protein bağlı reseptörlerini uyan bazı endojen ligandlar, reseptör tipleri ve ilişkili oldukları G-protein alt sınıfları çizelge 2.9'da verilmiştir (73).

Organizmada G-proteinlerinin aracı olduğu pek çok işlev vardır: Bunlar sinyal iletimi, ribozomal protein sentezinin yönetimi, hücre büyüme ve farklılaşmasının düzenlenmesi, endoplazmik retikuluma proteinlerin translokasyonu, hücrede veziküler trafiğin kontrol edilmesi vb. gibidir (63).

G-proteinleri işlevlerine göre ise çeşitli sınıflara ayrılır (4,59,61):

- I. Gas:** Adenilil siklaz enzimini aktive eder.
Ca⁺⁺ kanallarını aktive eder.
- II. Gai:** Adenilil siklaz enzimini inaktive eder.
K⁺ kanallarını aktive eder.
- III. Gaq:** Fosfolipaz C enzimini aktive eder.
- IV. Gao:** K⁺ kanallarını aktive eder.
Ca⁺⁺ kanallarını inaktive eder.
Fosfolipaz C enzimini aktive eder.
- V. Ga₁₂₋₁₃:** Rho-Rho kinaz yolağında rol alır.
- VI. Gβγ:** K⁺ kanallarını açar.
Ca⁺⁺ kanallarını kapatır.
Fosfolipaz A veya C enzimini aktive eder.
Adenilil siklaz enzimini aktive veya inhibe eder.
Reseptör kinazları aktive eder.
Transmembran Ca⁺⁺ pompasını aktive eder.

G-proteinlerin uyarıcı yani stimülatör (Gs) etkilerinin yanı sıra pek çok farklı etkileri de bulunur (Şekil 2.9). Bunlar farklı reseptörlerle etkinlik gösterirler. Örneğin uyarıcı G-protein (Gs) çeşitli hormon ve nörotransmitterler tarafından uyarıldığında cAMP için efektör enzim olan adenilil siklazı uyarırken, inhibitör G-protein (Gi) ise adenilil siklazı inhibe eden reseptörlere bağlanmaktadır. Gi proteinleri ayrıca bazı hücrelerde fosfoinozitol ikincil haberci sistemini uyarırken K⁺ ve Ca⁺⁺ kanallarını da regüle edebilmektedir. Gi ailesinin bir üyesi olan ve Gt1-Gt2 olarak da adlandırılan transducin'ler ise retinal rod ve kon hücrelerinde foto-transdüksiyonu yönlendirmektedirler. Heterotrimerik G-proteinlerinin alt gruplarınca düzenlenen efektörler çizelge 2.10'da verilmiştir (58,73).



Şekil 2.9: G protein aracılıklı sinyalizasyon mekanizmaları (73)

AC, Adenilil siklaz; **PLC**, Fosfolipaz C; **PI-3-K**, Fosfoinoziol-3-kinaz; **GIRK**, G-proteinle düzenlenen potasyum kanalları; **RhoGEF**, Rho guanin nükleotid değişim etkeni; **M**: Muskarinik reseptör; **PKC**, Protein kinaz C; **IP₃**, İnozitol trifosfat; **DAG**, Diaçil gliserol; **GABA**, Gama amino bütirik asit reseptörü; **5-HT**, serotonin reseptörü; **D**, dopamin reseptörü.

Çizelge 2.9: G-protein bağlı reseptörlerin endojen ligandları, reseptör tipleri ve ilişkili oldukları G-protein alt sınıfları (73).

Endojen Ligand	Reseptör	Bağlı G-protein Alt Sınıfı
Glutamat	mGluR1,5 mGluR2,3,4,6,7,8	Gq/11 Gi/o
Asetilkolin	M1,M3,M5 M2,M4	Gq/11 Gi/o
Adrenalin /Noradrenalin	α 1A; α 1B; α 1D α 2A; α 2B; α 2C β 1; β 2; β 3	Gq/11 Gi/o Gs
Dopamin	D1,D5 D2,D3,D4	Gs Gi/o
Histamin	H1 H2 H3,H4	Gq/11 Gs Gi/o
Kalsiyum	CaSR	Gq/11 Gi/o
ATP	P2Y ₁₁	Gq/11 Gs
ACTH	MC ₂	Gs
Kalsitonin	CT	Gq/11 Gs
Endotelin 1,2,3	ETA (ET-1, ET-2), ETB (ET-1, -2, -3)	Gq/11, G12/13, Gs
Glukagon	Glukagon	Gs
Somatostatin	SST1, SST2, SST3, SST4, SST5	Gi/o
GHRH	GHRH	Gs
PTH	PTH/PTHrP	Gs, Gq/11
FSH	FSH	Gs
LH	LH	Gs, Gi
Vazopressin	V1a,V1b V2	Gq/11 Gs
TRH	TRH-1, TRH-2	Gq/11
TSH	TSH	Gs, Gq/11, Gi, G12/13

Çizelge 2.10: Heterotrimerik G-proteinlerinin alt gruplarınca düzenlenen efektörler (73)

EFEKTÖR	EFEKTÖR ALT TIPI	G PROTEİNLERCE DÜZENLENME
AC	I	$G\alpha_s \uparrow$; $G\alpha_{i/o/z} \downarrow$, $G\beta\gamma \downarrow$
	II	$G\alpha_s \uparrow$; $G\beta\gamma \downarrow$
	III	$G\alpha_s \uparrow$; $G\alpha_i \downarrow$
	IV	$G\alpha_s \uparrow$; $G\beta\gamma \downarrow$
	V	$G\alpha_s \uparrow$; $G\alpha_{i/z} \downarrow$
	VI	$G\alpha_s \uparrow$; $G\alpha_{i/z} \downarrow$
	VII	$G\alpha_s \uparrow$; $G\beta\gamma \downarrow$
	VIII	$G\alpha_s \uparrow$; $G\alpha_i \downarrow$
	IX	$G\alpha_s \uparrow$; $G\alpha_i \downarrow$
PDE	6 γ (rod)	$G\alpha_{t-r} \uparrow$
	6 γ (cone)	$G\alpha_{t-c} \uparrow$
PLC	$\beta 1$	$G\alpha_{q/11} \uparrow$
	$\beta 2$	$G\alpha_{q/11} \uparrow$, $G\beta\gamma \uparrow$
	$\beta 3$	$G\alpha_{q/11} \uparrow$, $G\beta\gamma \uparrow$
	$\beta 4$	$G\alpha_{q/11} \uparrow$
GIRK	Kir3.1 (GIRK1)	$G\beta\gamma \uparrow$
	Kir3.2 (GIRK2)	$G\beta\gamma \uparrow$
	Kir3.3 (GIRK3)	$G\beta\gamma \uparrow$
	Kir3.4 (GIRK4)	$G\beta\gamma \uparrow$
VDCC	Ca _v 2.1 (P/Q-type)	$G\beta\gamma \downarrow$
	Ca _v 2.2 (N-type)	$G\beta\gamma \downarrow$
	Ca _v 2.3 (R-type)	$G\beta\gamma \downarrow$
PI-3-K	PI-3K β	$G\beta\gamma \uparrow$
	PI-3-K γ	$G\beta\gamma \uparrow$
GRK	GRK2	$G\beta\gamma \uparrow$
	GRK3	$G\beta\gamma \uparrow$
RhoGEF	Lsc/p115RhoGEF	$G\alpha_{13} \uparrow$
	PDZ-RhoGEF	$G\alpha_{12/13} \uparrow$
	LARG	$G\alpha_{12/13} \uparrow$

AC, Adenilil siklaz; PDE, Fosfodiesteraz; PLC, Fosfolipaz C; GIRK, G-proteinle düzenlenen potasyum kanalları; VDCC, Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları; PI-3-K, Fosfoinoziol-3-kinaz; GRK, G-proteinle düzenlenen kinaz; RhoGEF, Rho guanin nükleotid değişim etkeni

2.5.2.1. G-proteininin Hedefleri:

1) Adenilil siklaz/ cAMP sistemi:

G-proteinleri (özellikle G_s) adenilil siklaz enzimini aktifleştirerek, G_i ise bu yolu inhibe ederek işlev göstermektedir (56,61).

cAMP adenilil siklaz enzimi ile ATP'den meydana gelir. İntrasellüler ikincil haberci olarak cAMP pek çok olayda rol alır. Örneğin: depolanmış enerjinin mobilizasyonu (KC'de karbohidrat ve yağ hücrelerinde trigliserit yıkımı gibi), Ca^{++} homeostazı, kalp kasının kasılma hızının ve kontraksiyonunun artışı, adrenal ve seks steroidlerinin üretimi, düz kas gevşemesi vb. cAMP bu etkilerini cAMP bağımlı protein kinazları (A-kinaz) aktifleştirerek yapar. Bu tetramerik kinazlarda cAMP bağlayan düzenleyici dimer (R) ve iki adet katalitik zincir (C) bulunur. cAMP R dimere bağlanınca, aktif C zincirleri sitoplazmaya salınır ve oradanda nukleusa geçer. Burada ATP'deki fosfatları substratlarına aktarır. Bu substratlar sıklıkla enzimlerdir. Fosforilasyon hedef enzimleri aktive veya inhibe eder. Ayrıca iyon kanallarının aktivitesini artırır. Örneğin: lipazı aktifleştirerek lipolizi artırırken, glikojen sentazı inaktifleştirerek glikojen sentezini azaltır. Kalp kasında voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını etkiler. Bu kanalların fosforilasyonu Ca^{++} geçişini artırarak, kalp kontraksiyonunu artırır (56,58,62).

Hormonal uyarı sona erdiğinde cAMP'nin intrasellüler aktivitesi yine bir seri enzim ile sonlandırılır. cAMP ile stimüle olan fosforilasyon özgül ve özgül olmayan fosfatazlarla hızla tersine çevrilirken, cAMP'nin kendisi de siklik nükleotid fosfodiesterazlar ile 5'AMP'ye yıkılır (56,58,62).

2) Fosfolipaz C ve fosfoinozitol yolu:

G-proteinleri özellikle G_q, fosfolipaz C üzerinden etki gösterir (56). Fosfoinozitolin hidrolizi iyi bilinen ikincil haberci sistemlerindedir. Çeşitli hormonlar, nörotransmitter ve büyüme etkenleri G_q protein bağı reseptörlere bağlanarak bu yolu tetikler. Tümünde ana basamak fosfolipaz C- β adlı membran enziminin stimülasyonudur. Bu enzim plazma membranının minör bir fosfolipid bileşeni olan PIP₂ (fosfatidil inozitol 4,5 bifosfat)'ı özgül olarak hidroliz eder. PIP₂ böylece 2 ayrı ikincil haberciye ayrılır. Bunlardan birisi diaçilgliserol (DAG) diğeri ise inozitol-1,4,5-trifosfat (IP₃)dür (58).

DAG membranda yerleşiktir ve protein kinaz C (C kinaz) adı verilen bir enzimi aktive eder. Bu enzim Ca^{++} sensitif bir protein kinazdır. Protein kinaz C aktive olunca hedef proteinlerdeki özgül serin-treonin birimlerini fosforiller. MAP kinaz da bu hedef proteinlerden birisidir. MAP kinazın fosforillenmesi ile nukleusta bulunan Elk-1 adlı gen düzenleyici protein fosforillenir ve aktive olur. Elk-1 ise SRE (serum response

element) adı verilen kısa bir DNA dizisine bağlıdır. Elk-1'in aktivasyonu ile transkripsiyon aktifleşir (59).

Protein kinaz C'nin aktivasyonu bir başka yol ile de transkripsiyonu aktive eder. Bu yolda ise $\text{I}\kappa\beta$ fosforile olur ve bir diğer gen düzenleyici protein olan NF- $\kappa\beta$ salınır. Bu da nükleusa girerek özgül genlerde transkripsiyonu aktive eder. Örneğin TNF bu yolu kullanmaktadır (59).

IP3 ise suda çözünebilir özelliktedir ve sitoplazmaya diffüze olabilir. Burada internal depo veziküllerinden Ca^{++} 'un salınımına yol açar. Yüksek sitoplazmik Ca^{++} konsantrasyonu ise Ca^{++} 'un Ca^{++} bağlayıcı bir protein olan kalmodulin ile bağlanmasına öncülük eder. Bu ise Ca^{++} -Kalmodulin bağımlı protein kinazlar (CAMkinaz) gibi çeşitli enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar (58).

Fosfoinozitol sinyal yolu cAMP yoluna göre daha karmaşıktır. Örneğin farklı tip hücrelere özgül Ca^{++} -kalmodülün bağımlı protein kinazlar bulunur (myozin hafif zincir kinaz gibi). Ayrıca yapısal olarak 9 farklı tipte protein kinaz C bulunmaktadır (58).

cAMP sisteminde olduğu gibi sinyal iletiminin durması gerektiğinde IP3 hızla defosforile olur. DAG ise fosfatidik asite fosforile olur ve fosfolipidlerin yapısına girer. DAG ayrıca araşidonik asite deaçile olur. Ca^{++} ise sitoplazmadan Ca^{++} pompası ile uzaklaştırılır (58).

3) Ca^{++} - Kalmodülün yolu:

Ca^{++} intraselüler haberci olarak işlev görür. Ca^{++} sinyalizasyonunda 2 yol bulunur. Bunlardan birisi sinir hücrelerinde tanımlanmıştır. Plazma membranı depolarize olunca voltaj bağımlı Ca^{++} kanallarından Ca^{++} hücre içine girer. Diğer yol ise reseptör aktivasyonudur. Ekstrasellüler sinyal molekülleri (birincil haberci) hücre yüzey reseptörüne bağlanarak Ca^{++} kanallarının açılmasına yol açar. Ya reseptörün kendisi kanal içerir ya da reseptör G-protein aracılığı ile cAMP gibi ikincil habercileri uyarır. Öte yandan endoplazmik retikulumdaki Ca^{++} kanallarının açılması yine bir ikincil haberci olan IP3 ile sağlanmaktadır (59).

Ca^{++} kalmodülün ile bağlanınca kalmodulinin yapısı değişir, bu ise çeşitli enzimleri örneğin protein kinazları aktive veya inhibe eder. Ca^{++} 'un hücrelerdeki pek çok etkisi Ca^{++} -kalmodülün bağımlı protein kinazlar (CAM kinaz) ile katalizlenen protein fosforilasyonu ile gerçekleşir. Bu kinazlar proteinlerdeki serin-threonin

birimlerini fosforiller ve hücre yanıtı oluşur. Bu kinazlara örnek olarak düz kas kasılmasını aktifleştiren myozin hafif zincir kinaz, glikojen yıkımını aktifleştiren fosforilaz kinaz ve sinir sistemindeki çok işlevli CAM kinaz II verilebilir (59).

4) cGMP yolu:

cAMP'nin aksine cGMP yolu yalnızca birkaç tip hücrede bulunur. İntestinal mukoza ve vasküler düz kaslarda cGMP tabanlı sinyal mekanizmaları cAMP'ninkine paraleldir. Hücre yüzey reseptörü ile tanınan ligandlar membran bağımlı guanilil siklazı aktive ederler ve cGMP oluşur. cGMP ise cGMP bağımlı protein kinazları (G kinaz) uyararak etkisini gösterir. cGMP'nin bu hücrelerdeki etkisi ise ya siklik nukleotidin enzimatik yıkımı ile ya da kinaz substratların defosforilasyonu ile sonlanır (58).

cGMP artınca düz kas hücrelerinde kinaz ile yönlendirilen bir mekanizma ile myozin hafif zincirleri defosforile olur ve düz kaslar gevşer. Düz kaslarda 2 farklı guanilil siklaz enzimi görevlidir. Bunlardan birisi membran bağımlıdır ve tirozin kinaz ailesine benzer aktivitesi vardır. Örneğin atrial natriüretik faktör (ANF) transmembran reseptörün ekstraselüller kısmına bağlanınca reseptörün intraselüler kısmında yer alan guanilil siklaz enzimini aktive eder. Diğer yandan bazı guanilil siklaz enzimleri ise sitoplazmada yer alır. NO hücre membranını geçebilen bir ligand'dır. Hücre içine girerek sitoplazmik guanilil siklazı aktive etmekte ve cGMP oluşumunu tetiklemektedir (58).

5) İyon kanalı düzenlenmesi:

G-proteinleri iyon kanallarını direk veya indirek olarak regüle ederler. Direk mekanizmada G-protein kanal ile doğrudan ilişkilidir, olaylar plazma membranında gerçekleşir. Burada ikincil haberciler görev almazlar. G-proteininin α alt birimi ve $\beta\gamma$ alt birimi kanal kontrolünde mediatördürler. Direk etkilere örnek olarak kalp kası ve nöronlardaki K^+ kanalları verilebilir. İndirek olarak ise G-proteinleri cAMP ve IP3 gibi ikincil haberciler aracılığı ile kanalları regüle ederler (56,59,62).

6) Fosfolipaz A₂ yolu:

Reseptör bağımlı G-proteinleri ayrıca fosfolipaz A₂'yi aktifleştirerek araşidonik asit oluşumuna yol açar. Ayrıca diaçil gliserol de araşidonik asit oluşturmak üzere kesilir. Araşidonik asitin kendisi de bir ikincil habercidir. Ayrıca eikasonoidlerin oluşumunda rol almaktadır (62).

G-proteinlerinin işlevlerindeki bu çeşitlilik, yapının pek çok alt birimden oluşmasından ve bunların da farklı etkilere sahip oluşundan kaynaklanmaktadır. Tüm bu sinyal yollarının yanı sıra G-protein aracılı sinyal sistemi yukarıda sözedilenlerden farklı bazı sinyal yollarının da düzenlenmesinde rol almaktadır. Örneğin, G-protein bağlı reseptörler ve reseptör tirozin kinazlar arasında çift yönlü bir ilişki söz konusudur. G-protein bağlı reseptörler Ras/MAP kinaz sinyal yolunu aktive ederken, reseptör tirozin kinazlar da G-proteinlerinin ve reseptörlerinin ekspresyonlarını düzenlerler. Reseptör tirozin kinazlar aracılığıyla olan bu düzenlenme, G-proteinlere ait sinyal yolunun uzun dönemde ayarlanmasını sağlamaktadır (86).

2.5.3. G-protein Aracılı Sinyal Yolunun Düzenlenmesi

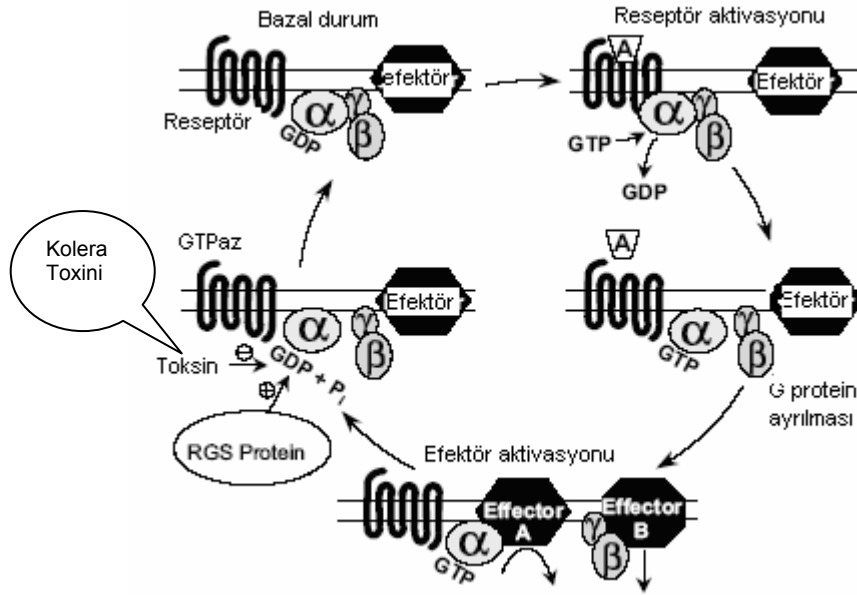
G-protein bağlı reseptörlerle ilişkili sinyal yolları kısa ve uzun süreli olarak regüle edilmektedir. Kısa süreli düzenlenmede reseptörün kendisi ve heterotrimerik G-proteini rol almaktadır. G-protein bağlı reseptör kinazlar ile fosforillenen reseptöre endozomlarda ayırıcı (uncoupling) proteinler (örneğin arrestin) bağlanınca reseptör defosforile olarak plazma membranına dönmektedir (87,88). G-protein düzeyinde ise fosforilasyon, asetilasyon veya lipid modifikasyonları reseptörün membrana olan afinitesini değiştirmektedir. Uzun dönemde ise mRNA düzeyinde transkripsiyonel düzenlenmeden bahsedilmektedir (87).

G $\beta\gamma$ dimerinin aktivitesi esas olarak, G α alt biriminin, G β üzerindeki bağlanma bölgesine bağlanması ile inhibe olmaktadır (4). G $\beta\gamma$ dimerinin aktivitesi yine dimerin phosducin (retina ve pineal bezden salınan sitozolik bir protein) veya pleckstrin (platelet ve lökosit C kinaz substrat protein) gibi moleküllere bağlanması ile sonlanmaktadır (75).

G α alt biriminin GTPaz aktivitesi sinyal yolunun deaktivasyonunda önem taşımaktadır. *İn vivo* G-protein sinyal yolunun deaktivasyonu, *invitro* yapılan GTP hidrolizinden 10–100 kat daha hızlıdır. Bu durum α alt birimini deaktifleştiren GTPaz aktifleştirici proteinlerin varlığını göstermektedir. Bu proteinler G-protein sinyalizasyon düzenleyicileri (RGS proteinleri: Regulators of G-protein Signalling) adını almaktadır. Bu proteinler G-proteinlerini inaktif heterotrimer formunda tutmaktadırlar (Şekil 2.10) (8).

Yaklaşık 25 kadar RGS proteini izole edilmiştir (87). Sadece insan miyokardında 16 farklı tipte protein bulunur. RGS proteinleri, genlerinin organizasyonuna, yapısal benzerlik ve işlevsel farklılıklara bağlı olarak altı alt aileye ayrılmaktadır. Hepsinde 120 aminoasitlik homolog bölge vardır (67).

RGS ailesine bağlı proteinler, G-protein aracılı sinyal yolunda hızlı sonlandırıcılar olarak rol almaktadırlar. Homolog RGS bölgelerinde GTPaz aktifleştirici işlevleri bulunur. Ayrıca G-proteinlerinin efektörlere bağlanmasını önleyen efektör antagonisti gibi de davranmaktadırlar. GTP hidrolizinin ardından α alt biriminin $\beta\gamma$ dimerine olan afinitesini artırıp, efektörlerle etkileşecek serbest dimer sayısını azaltırlar (87).



Şekil 2.10: G protein aracılı sinyal yolunun düzenlenmesi (73)

2.6. G PROTEİNLERİ İLE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR

Sinyal yollarında yer alan proteinler mutasyonlar için olası hedeflerdir. G-protein alt birimlerindeki pek çok mutasyon memeli fizyolojisindeki merkezi görevleri nedeniyle ölümcül olabilmektedir. Gen haritalanmasının temel amaçlarından birisi de hastalığa neden olan gen lokuslarının belirlenmesidir (5,8).

Bozuk G-protein aracılı sinyal iletimi, G-protein bağı reseptörler ve G-proteinlerindeki ekspresyon düzeyinde oluşan farklılıklar veya translasyon sonrası modifikasyonlar nedeniyle gelişen, nicelik ve/veya niteliksel değişikliklere bağı olarak ortaya çıkmaktadır (89).

G-protein bağı reseptörler veya G-proteinleri ile ilgili mutasyonlar işlev kaybı veya işlev kazanımına yol açmaktadır. İşlev kaybına yol açanlar kalıtsal bozukluklar iken, işlev kazanımına neden olan mutasyonlar ise genellikle germ line aşamasında izlenen kalıtsal hastalıklar veya sporadik olarak görülen somatik olaylardır (89).

Endokrin hastalıklar, ilgili hormonun az veya çok salınımı ile ilişkilidir. G-protein veya reseptör mutasyonları her iki şekilde de hastalıklara yol açabilirler. İşlev kaybı izlenen mutasyonlar hormon direncine neden olarak, klinikte normal bir reseptör aktivasyonu varlığında hormon yetmezliği varmış gibi belirti verirler. Mutasyonla oluşan hormon direnci ilgili hormonun dolaşımdaki artmış düzeyi ile birlikte (89). İşlev kazanımı şeklindeki mutasyonlarda ise, ilgili hormonun hipersekresyonu bulunur, fakat dolaşan düzeyleri baskılanmıştır ve hedef bezde otonom hiperfonksiyon vardır (89).

G-protein sinyal yolunda görülen mutasyonlara bağı gelişen hastalıklar aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

1) G-protein bağı reseptörlerle ilgili mutasyonlar:

G-protein bağı reseptörlere bağı mutasyonlar işlev kaybı veya kazanımı ile sonuçlanmaktadır (Çizelge 2.11). İşlev kaybına neden olan mutasyonlar normal mRNA ve/veya protein sentezini bloke eder, sentez edilmiş proteinin normal hücre içindeki lokalizasyonuna ulaşmasını önler veya proteinin sentez ve hedefe yönelme açısından normal işlev göstermesini engeller. Pek çok G-protein bağı reseptör mutasyonları yanlış anlamlı (missense) mutasyonlardır ve proteinin anormal katlanması ve endoplazmik retikulumda tutulumu ile ilgilidir. G-protein bağı reseptörlere ait işlev kaybı mutasyonları, sentez ve hedefe yönelme aşamasında görülenlerin dışında, reseptör aktivasyonu ve agonist bağlanması aşamasında da zayıflama şeklinde izlenebilir. G-proteinini aktive etmek amacıyla olan reseptör birleşmesi aşamasında da zayıflama olabilir (89).

İşlev kazanımı şeklinde izlenen mutasyonlar ise uygunsuz veya sürekli aktivasyona neden olmaktadır. Hormon bağlanması olmadan, sürekli bir şekilde aktive

olan G-protein bağı reseptörler nedeniyle G-protein aktivasyonu olmaktadır. Bu şekildeki mutasyonlar GDP salınımını hızlandırmakta ve reseptör bağımsız G-protein aktivasyonuna neden olmakta veya G-protein aktivasyonunu sonlandıran GTPaz reaksiyonunu bloke etmektedir (89).

Çizelge 2.11: G-protein bağı reseptör mutasyonları nedeniyle ortaya çıkan hastalıklar (89)

Reseptör	Hastalık	Mutasyon tipi
V2 vazopressin	Nefrojenik diabetes insipidus	Kayıp
ACTH	Ailevi ACTH direnci	Kayıp
GHRH	Ailevi GH eksikliği	Kayıp
FSH	Hipergonadotropik overyan disgenezi	Kayıp
LH	Erkek psödohermafroditizm	Kayıp
TSH	Ailevi hipotiroidizm	Kayıp
CaR	Ailevi hipokalsiürik hiperkalsemi / Neonatal şiddetli primer hiperparatiroidizm	Kayıp
Rodopsin	Retinitis pigmentosa	Kayıp
LH	Ailevi erkek pubetre prekoks	Kazanılmış
TSH	Sporadik hiperfonksiyonel tiroid nodülleri	Kazanılmış
TSH	Ailevi otoimmün olmayan hipertiroidizm	Kazanılmış
CaR	Ailevi hipoparatiroidizm	Kazanılmış
PTH/PTHrP	Jansen metafizyal kondrodizplazi	Kazanılmış

2) G-protein α alt birimine bağı hastalıklar:

G-proteinlerinin keşfedilmesinin ardından yapılan çalışmalar sıklıkla α alt birimine yönelmiş olup, bu bölüme ait mutasyonlar çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Çizelge 2.12). Bu mutasyonları eksternal ajanlarla oluşanlar, somatik mutasyonlar ve genetik mutasyonlar şeklinde sınıflandırmak mümkündür (5):

a) Eksternal ajanlara bağlı olarak oluşan mutasyonlar:

Bu grup hastalıklara örnek olarak kolera toksini ve boğmaca (pertussis) toksini verilebilir. Kolera toksini bir ADP ribozil transferazdır. NAD'den α s'in Arg 201 birimine ADP transfer etmektedir. Normal koşullarda burada GTP'nin GDP'ye hidrolizi gerçekleşmektedir. Buraya ADP riboz grubu gelince GTP hidrolizi ve dolayısıyla G-protein inaktivasyonu önlenir. Sonuçta hormon uyarımından bağımsız olarak adenilil siklaz enzimi aktive olur, cAMP miktarı artar, barsaktan Cl⁻ iyonu ve su salınır, sonuçta diyare gelişir (5,8).

Boğmaca toksini ise G-proteinlerinin α i alt birimlerinin karboksi terminal bölgelerindeki sistein kalıtlarını ribozillemektedir. G-proteini GDP bağlı halde kalmakta ve aktifleşmesi önlenmektedir. Böylece G α i'nin adenilil siklaz enzimini inhibe etmesi nlenmiş olmaktadır. cAMP düzeyi artmakta ve solunumsal sekresyonlar ve mukus üretimi artmaktadır. Sonuç olarak kolera toksini Gs proteininin GTP bağlı aktif şeklini, boğmaca toksini ise Gi proteininin GDP bağlı inaktif formunu stabilize etmektedir (5,8).

b) Somatik mutasyonlar:

Genellikle α s'in Arg 201 mutasyonları hastalıklara neden olmaktadır. Örneğin tiroid ve hipofiz adenomları bu bölgede görülen yerine koyma şeklindeki (substitution) mutasyonlarla ilgilidir. McCune Albright sendromunda görülen somatik mutasyonlar ise iki yanlış anlamlı (missense) mutasyondur. Bunlarda Arg 201-His, Arg 201-Cys şeklinde aminoasit değişimleri izlenmektedir. Bu sendrom polioyotik fibröz displazi, cafe-au-lait lekeleri, ve otonom endokrin hiperfonksiyonla seyretmektedir. Bu somatik mutasyonların etkileri embriyonik gelişme sırasında meydana gelir. Bu mutasyonlar adenomlarda geç, McCune Albright sendromunda ise daha erken embriyonik gelişim evrelerinde oluşur. Mutantın etkisi hücrede aktif olan sinyal ileti yolunda gözlenmektedir. Mutant α s GTP'yi hidrolize edemez ve protein aktif halde kalır, bu ise hiperproliferasyon ile sonuçlanır (5,89,90).

c) Genetik mutasyonlar:

G α s'i kodlayan gen GNAS I genidir. Bu gene ait G α s mutasyonları genellikle aktifleştirici, inaktifleştirici türden mutasyonlardır. Aktifleştirici mutasyonlar sıklıkla somatik mutasyonlardır. Bazı durumlarda her iki işlev aynı anda izlenebilmektedir (8).

İnaktifleştirici türdeki GNAS I gen mutasyonlarında genel hormon direnci meydana gelmektedir. Bu tip mutasyonlara bağlı olarak gelişen ve en iyi tanımlanmış

hastalık psödohipoparatiroidizm Tip I'dir. Normalde PTH reseptörü Gs bağlıdır ve cAMP'yi aktifleştirerek etki göstermektedir. Bu kişilerde iki adet yanlış anlamlı (missense) mutasyon izlenmektedir. Bu mutasyonlar aminoasit değişiklikleri ile seyreden ve sıklıkla işlev kaybı ile sonuçlanan mutasyonlardır. Arg385-His mutasyonunda reseptör aracılı Gs uyarılması engellenmektedir. Arg231-His mutasyonunda ise reseptör aracılı Gs'in GTP bağlanması engellenmektedir. Mutasyonlar sonucu Gs aktivitesi azalınca, çeşitli hücre tiplerinde (eritrosit, fibroblast, trombosit gibi) mRNA ve protein düzeyleri azalmaktadır. Bu kişilerde serum PTH düzeyleri yüksektir. Hipokalsemi, hiperpotasemi ile seyreder. Renal işlevler normaldir. PTH aktivitesine karşı direnç vardır (5,84,89,90).

Aktifleştirici türdeki gen mutasyonları sıklıkla hipofiz somatotrop tümörlerde (akromegali ile seyreden), hiperfonksiyone tiroid adenomlarında izlenmektedir. Bu tür mutasyonlar germ-like olmaktan çok sıklıkla somatik mutasyonlardır (89). Bu mutasyonlar hipofiz, tiroid adenomları, adrenal bez ve overe ait adenomlar veya endokrin bezlerin hiperfonksiyon sendromları olarak kliniğe yansımaktadır (8). Arg201-Cys, Gln227-Arg şeklindeki mutasyonlar sonucu özellikle GDP/GTP bağlanması ile ilgili durumlar ortaya çıkmaktadır (8,89). Aktifleştirici GNAS I gen mutasyonlarında gsp onkogeni meydana gelmekte ve G-proteinin intrinsek GTPaz aktivitesi inhibe olmakta ve sürekli bir aktivasyon durumu oluşmaktadır. Böylelikle adenilil siklaz enzimi sürekli olarak aktif halde kalmaktadır ve cAMP oluşumu artmaktadır. cAMP burada mitojenik bir sinyal gibi davranmaktadır. Protein kinaz A aktivasyonunun ardından cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) fosforillenmekte ve bu da nükleusta cAMP yanıt elemanının (CRE) etki göstermesine ve transkripsiyonun artışına neden olmaktadır (8).

Psödohipoparatiroidizm Tip I ve gonadotropinden bağımsız puberte prekoks birlikteliği (testotoksikozis) gibi bazı durumlarda ise her iki türden işlev değişiklikleri izlenebilmektedir. Ala366-Ser, Arg385-Ser mutasyonlarında hem işlev kazanımı, hem de kaybı birlikte izlenmektedir. Lüteinizan hormon (LH) reseptörü ile testiküler leydig hücrelerinde testosteron otonom olarak üretilirken, bazı dokularda hormona direnç gelişmektedir. Mutant protein 37 °C'de hızla yıkılmakta, Gas inaktive olmaktadır ve psödohipoparatiroidizm Tip I şeklinde genel hormon direnci ortaya çıkmaktadır. Testiste ise ısı 3-5 °C daha düşük olduğu için bu ısıda mutant protein aktiftir. Böylece

reseptörden bağımsız GDP ayrılması olmakta, G-protein aktifleşmekte ve leydig hücrelerinde cAMP oluşumuna bağlı hormon salgılanmakta ve puberte prekoks oluşmaktadır (8,89,90).

G α s'i kodlayan GNAS I gen mutasyonları dışında G α i2 ile ilgili mutasyonlar da bulunur. Kodlayıcı gen GNAI 2'dir. Buradaki nokta mutasyonları GTP bağlama bölgesinde meydana gelmektedir ve aktifleştirici türden, somatik mutasyonlardır. Normalde G α i2 yolağında adenilil siklaz enzimi inhibe olmakta, cAMP azalmaktadır. Ayrıca bu reseptörler mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAP kinaz) yolunu da aktileştirmektedir. Arg179-His mutasyonunda adrenal korteks ve over seks kord stromal tümörleri oluşmaktadır. Gln205-Arg mutasyonunda ise işlevi olmayan hipofiz adenomu gelişmektedir. Oluşan gip 2 onkojenine bağlı olarak ise over granüloza hücre tümörleri ve tekomalara rastlanmaktadır. Bu onkojen aracılıklı hücre proliferasyonu muhtemelen MAP kinaz aktivasyonu ile ilişkilidir (8).

Ca⁺⁺-Kalmodülin ve protein kinaz C yoluna ait G α q mutasyonları ise tanımlanmamıştır (8).

Çizelge 2.12: G-protein α alt birimine ait mutasyonlara bağlı ortaya çıkan hastalıklar (89)

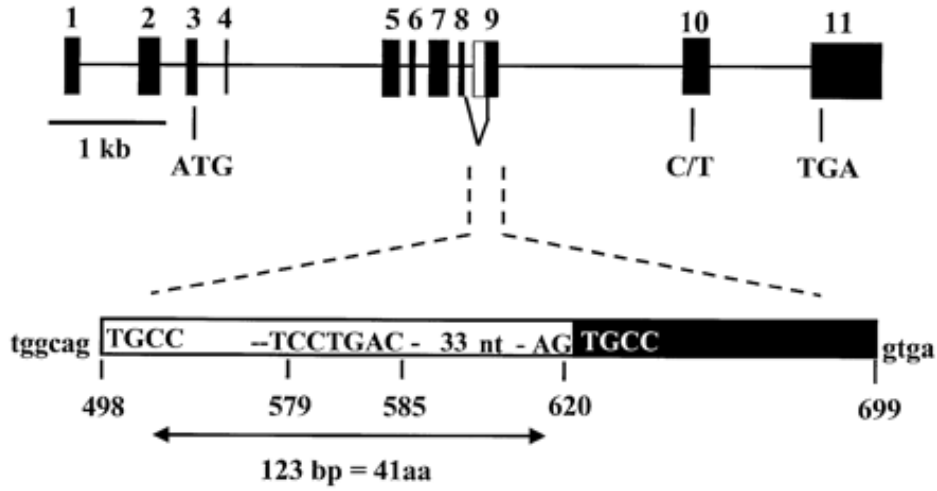
G-protein α alt birimi	Hastalık	Mutasyon Tipi
α s	Psödohipoparatiroidizm Tip I	Kayıp
α s	Psödohipoparatiroidizm Tip I ve puberte prekoks	Kayıp/ Kazanılmış
α s	Akromegali, hiperfonksiyone tiroid nodülleri, Mc Cune Albright sendromu	Kazanılmış
α i2	Over ve adrenokortikal tümörler	Kazanılmış

3) G-protein $\beta\gamma$ alt birimine bağlı hastalıklar:

G-protein $\beta\gamma$ dimeri sinyalizasyonda önemli rol almaktadır. Bu nedenle β ve γ alt birimlerindeki mutasyonlar da hastalıklarla ilişkili olabilmektedir. Bu mutasyonlar hakkındaki bilgiler daha sınırlı olmakla birlikte β 3 genindeki mutasyonlar son yıllarda çeşitli hastalıklarla (örneğin hipertansiyon) ilişkilendirilmiştir (5,8).

2.7. GNB3 GENİ

Heterotrimerik G-proteinleri hücre içi sinyal yollarında yer alan transmembran reseptörlerinin önemli bir bileşenidir. G-proteinlerinin $\beta 3$ alt birimi kromozom 12p13'de (12. kromozomun kısa kolunun, 1. segment ve 3. bandında) yerleşik olan GNB3 geni tarafından kodlanmaktadır. Gen 11 ekzondan oluşmuştur. 3. ekzonda ATG başlama kodunu, 11. ekzonda ise TGA sonlanma kodunu yer alır (Şekil 2.11)(10).



Şekil 2.11: GNB3 geni (10)

2.8. GNB3 GEN POLİMORFİZMLERİ

G $\beta 3$ 'ü kodlayan gen GNB3'dür. Bu gene ait çeşitli polimorfizmler üzerinde çalışılmıştır (Çizelge 2.13). Bunlar G814A, A657T, C1429T, A(-350)G, ve C825T gibidir. C825T polimorfizmi esansiyel hipertansiyon, obezite, diabetik nefropati gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (9).

Çizelge 2.13: GNB3 gen polimorfizmleri (91)

Polimorfizm	Lokalizasyon (bp)	Alleller	Sekens	Yapı
G(-350)A	-350	(-350) G (-350) A	gccagtcaagtgatc gccagtca <u>G</u> tgatc	Promotor Promotor
G76A	1387	76G 76A	caggaaagcctgtgct cagga <u>A</u> acctgtgct	Ala Thr
G1906T	1906	1906G 1906T	ttttatgagccagata ttttat <u>C</u> agccagata	Int.4 Int.4
G2906A	2906	2906G 2906A	gagagcgggagtgagg gagagc <u>A</u> ggagtgagg	Int.5 Int.5
T657A	3725	657T 657A	cctgccgtcagacttt cctgccg <u>A</u> cagacttt	Arg Arg
A3882C	3882	3882A 3882C	gtattttttt gt <u>C</u> ttttttt	Int.9 Int.9
G5177A	5177	5177G 5177A	gcagagcgggcgagggg gcagagc <u>A</u> ggcgagggg	Int.9 Int.9
G5249A	5249	5249G 5249A	aaaccaaggaggagaca aaaccaag <u>A</u> ggagaca	Int.9 Int.9
G814A	5489	814G 814A	atctcggcatc atctgc <u>A</u> gcac	Gly Ser
C825T	5500	825C 825T	gtccgtggcct gtc <u>T</u> gtggcct	Ser Ser
InsCACA	6496	CACA- CACA+	cccacacaccacacat ccca <u>CACA</u> cacaccacacat	Int.10 Int.10
C1429T	7086	1429C 1429T	ctggcaccactagggtcctg ctggcac <u>T</u> actagggtcctg	3'-UTR 3'-UTR

Bu güne kadar bildirilmiş dört çeşit GNB3 Gβ3 varyantı vardır. 340 aminoasitten oluşan doğal tip (wild) Gβ3 ve çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş olan Gβ3s en çok bilinenlerdir (92). GNB3 gen polimorfizmi ilk olarak Siffert W. ve arkadaşları tarafından açıklanmış bir polimorfizmdir ve öncelikle hipertansiyon ile ilişkilendirilmiştir (93). Bu polimorfizm, T allel taşıyıcılarında Gβ3s şeklinde izlenen varyant, ekzon 9'da 498-620. nükleotidde 123 baz çiftlik delesyon, translasyon sonrası

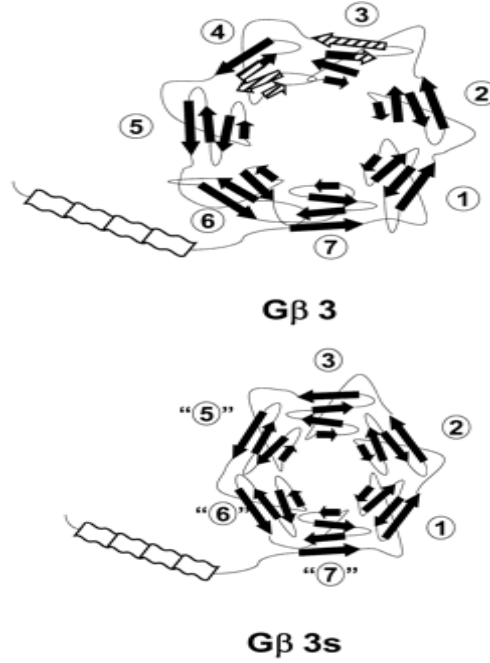
41 aminoasit kayıp ve bir WD tekrar domaini kaybı ile karakterizedir (93,94). Ekzon 10'da meydana gelen polimorfizm ve oluşan T alleli ekzon 9'daki kriptik splicing bölgesinin tanınabilmesini sağlamaktadır (13).

GNB3'ün 10. ekzonunda C825T şeklinde bir dimorfizm tanımlanmıştır (93,95). Ekzon 10'da 825. nükleotidde C-T şeklinde tek baz değişikliği saptanmıştır (11). Bu durum nedeniyle T alleli Gβ3s şeklinde kodlanan bir splice varyant (βs) oluşumu ile ilişkilidir (93). Ekzon 9'daki alternatif RNA kaymasına (splicing) bağlı olarak, 498–620. nükleotidlerde 123 baz çiftlik bir delesyon meydana gelmektedir. Bu durum wild type (CC) genotipe göre 41 aminoasitlik bir kayıpla sonuçlanmaktadır (93). Bu çerçeve içi (in-frame) delesyon nedeniyle normalde yedi adet olan WD tekrar kalıtında bir adet kayıp olmakta ve pervane benzeri (propeller) parça sayısı altıya inmektedir (Şekil 2.12) (93).

Heterotrimerik G-proteinlerinin β3 alt birimini kodlayan GNB3 geninde, ekzon 10'daki C825T polimorfizmi sonucu doğal (wild) tip allel (C) Timin kalıtı (T) ile yer değiştirir. Sonuçta CT (heterozigot) ve TT (homozigot) genotipler meydana gelir (93).

1998 yılında Winfried S ve arkadaşlarının Gβ3s varyantını tanımlamasının ardından, 2003 yılında Roskopf D ve arkadaşları da Gβ3s-2 şeklinde tanımlanan ek bir splice varyant tarif etmişlerdir. Bu biyolojik olarak aktif varyant da C825T polimorfizminin yer aldığı ekzon 9'daki alternatif splicing nedeniyle gözlenmektedir. Doğal tipe göre 129 baz çifti eksiktir ve altı adet WD tekrarı içermektedir. Gβ3s ve Gβ3s-2 varyantlarında farklı pervane benzeri yapılar eksik bulunmaktadır. Gβ3s'de 3-4. yapraklar eksik iken, Gβ3s-2 'de ise 5-6. yapraklar yoktur. Kalp, kan hücreleri ve tümör dokusundan ekspresyonu T alleli ile korelasyon göstermektedir. Bu varyant da değişik γ alt birimleri ile etkileşmekte ve hücre içi sinyal yolunu uyarmaktadır. Sf9 insekt hücrelerinde, Gβ3s-2 varyantının ekspresyonu sonucunda bu varyant G γ12 ile birlikte Gαi2'nin reseptörle uyarılan aktivasyonunu artırmaktadır. Yine bu varyantın memeli hücrelerinden ekprese edilmesi sonucunda mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) kaskadı da aktive olur (96). Bu varyantların dışında fibroblast, B lenfoblast, retinoblast, mesane kanser dokusu, yağ doku ve kolondan ekprese edilen Gβ3v varyantı da bulunmuştur. Bu varyant ekzon 10'da intron 9 bölümlerinin de alternatif kullanımı sonucu oluşmuştur. Yedi değil sadece dört WD tekrar yaprağı vardır. 5, 6, 7. pervane yaprakları yoktur. C terminali uzundur. C terminalindeki 59 aminoasit yenidir ve bunlar

Gβ3s varyantında yer almamaktadır. Gβ3v varyantı C825T polimorfizmi ile ilişkisi yoktur (92).



Şekil 2.12: G β3 ve Gβ3s yapıları (10)

2.8.1. GNB3 C825T Gen Polimorfizmi Sıklığı

Bu polimorfizmin sıklığı ile ilişkili dünyanın pek çok bölgesinde yapılmış yerel çalışmalar vardır (11,97,98). Konu ile ilgili olarak yapılmış en kapsamlı çalışma ise 1999 yılında Siffert W. ve arkadaşlarınca yapılan ve dünyadaki pek çok ırkı kapsayan çalışmadır (16). Çalışmaya beyaz ırk (Almanya, İspanya, İtalya, Yunanistan, Finlandiya, Rusya, Polonya, Hırvatistan, Macaristan, Mısır, Suudi Arabistan, Türkiye), siyah Afrikalılar (Gine, Gana, Nijerya, Kamerun, Kongo, Namibya, Zimbabve, Güney Afrika, Kenya, Uganda, Tanzanya, Amerika zencileri) Pigmeler, Mongoloidler (Çin, Kore, Japonya, Tayland), Amerika yerlileri (Brezilya, Şili, Doğu Kanada), Avusturalya yerlileri, vb. değişik ırklardan insanlar dahil edilmiştir (16).

Türkiye’de bu gen polimorfizm sıklığı ile ilgili yapılmış bir çalışma ulaşılabilen yerli ve yabancı literatürlerde yer almamaktadır. Çalışmaya dahil edilen 138 Türkiye vatandaşı ise yurt dışında yaşamakta olan kişilerdir. Çalışma sonuçlarına göre GNB3

C825T gen polimorfizmine ait genotiplerin etnik dağılımı çizelge 2.14’de, ülkelere göre T allel sıklıkları şekil 2.13’de verilmiştir.

Çizelge2.14: GNB3 C825T gen polimorfizmine ait genotiplerin etnik dağılımı (16)

Etnik Köken	Çalışmaya Katılanların Sayısı (n)	TT genotipi (n)	CT genotipi (n)	CC genotipi (n)	T allel sıklığı (%)
Siyah Afrikalılar	1015	625	349	41	%79
Beyaz Irk	3289	348	1443	1498	%33
Beyaz Irk (Türkiye)	138	19	66	53	%38
Mongoloidler	520	100	276	144	%46
Amerika yerlileri	245	16	98	131	%26
Avustralya yerlileri	30	13	17	0	%72



Şekil 2.13: Dünyada ülkelere göre GNB3 825T allel sıklıkları (16)

2.8.2. GNB3 C825T Gen Polimorfizminin Etkileri

T alleli, 41 aminoasitlik delesyonu olan bir splice varyantın ekspresyonuyla ilişkilidir (95). G β 3s olarak bilinen varyant, GNB3 geni 825T allel taşıyıcılarında gözlenir ve biyolojik olarak aktiftir (99). Bu varyant G-protein aktivasyonunda artış şeklinde bir işlev göstermektedir (95,99). T allel taşıyıcılarında G $\beta\gamma$ dimeri ile regüle edilen efektör sistemler çok daha kolay aktifleşmektedir (99).

T allel taşıyıcılarında β s alt birimi G α i2 ve G γ 5 ile beraber işlev göstermektedir (10,93). Böylece G-proteininin GTP bağlamasına yönelik uyarımı artmakta, G α i2 protein aktivitesi de artmaktadır (10).

GNB3 geni T lenfosit yanıtının artışı ve enflamatuvar yanıtla da ilgilidir. GNB3 T alleli uyarılmış hücrel immünitinin bir belirteci olarak kabul edilebilir. 825T allel taşıyıcılarında güçlü hücrel immün yanıt izlenilmektedir. Bu kişilerde immün hücre aktivasyonu tesbit edilmiş ve genellikle artmış nötrofil kemotaksisi ile ilişkili bulunmuştur (16).

T allel taşıyıcılarında nötrofille ilişkili olarak artmış kemotaktik yanıt izlenmektedir. G β 3s varyantının ekspresyonu hücrenin kemotaktik işlevini artırmaktadır (13,14). Kemotaktik yanıtın yanı sıra, C allele sahip olanlarla karşılaştırıldığında T allel taşıyıcıları CD4+ T lenfositlerinin sayısı, mekanizması belli olmamakla birlikte, anlamlı derecede artmıştır. Bu hücreler hücrel immün yanıtta özgün oldukları için, sayılarındaki artış immün yanıtta bir artışa neden olur. CD4+ hücrelerinin aksine bu gen polimorfizminde CD8+ hücrelerinin sayısı normaldir (14). Yapılan bir çalışmada T allel taşıyıcılarında aşılama daha etkili olduğu, enfeksiyonlara karşı korumanın daha iyi olduğu ve allograft rejeksiyonunun daha az olduğu izlenmiştir (14).

2.8.3. GNB3 C825T Gen Polimorfizmi İle İlişkili Hastalıklar

GNB3 genindeki splice varyant üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda T allel taşıyıcılarının hipertansiyon, ateroskleroz, inme (stroke), obezite, immün yanıtta artış gibi çeşitli durumlarla ilişkili olduğu gözlenmiştir (10,12,13,14,15,16).

Siffert W. ve arkadaşları GNB3 C 825T gen polimorfizmini ve bunun hipertansiyon ile ilişkisini gösteren ilk gruptur. Hipertansiyon ile ilgili yapılan çalışmada normotansif bireylerde T allel sıklığı %25 olarak gözlenirken, hipertansif bireylerde %31 olarak bildirilmiştir (93). Japonyada yapılan ve hipertansiyonla ilgili bir

çalışmaya göre, kadın hastalarda TT genotipi hipertansiyon açısından CC'ye oranla 2,31 kat risk taşımaktadır. Yine hipertansif kadın hastalarda T alleli (%56,3), normotansif kadınlarla (%46,2) karşılaştırıldığında daha yüksek frekansta izlenmektedir (97). Ishikawa ve arkadaşları ise hipertansiyon ve 825T alleli arasında ilişki bulamazken, artmış kolesterol ve azalmış serum potasyum düzeyleri olan ilişkisinden söz etmişlerdir (100). Wascher TC ve arkadaşları ise bu polimorfizmi ateroskleroz hastalığında çalışıp, 825T allel taşıyıcılarında artmış karotid ateroskleroz riskini bildirmişlerdir (95). T allel taşıyıcılarında anstabil anjinanın daha sık görüldüğü ise Von Beckerath N ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışma sonucudur (101). Yine bu konudaki başka bir çalışmada da T alleli ve koroner arter hastalığı ilişkisi üzerinde durulmuştur (15). İnsülin direnci de bu polimorfizm ile ilişkilendirilmiş farklı bir konudur. CT ve TT genotipleri taşıyan, yaşlı hipertansif hastalarda insülin direnci daha sık izlenmektedir (102). Turner ve arkadaşları da yaptıkları araştırmada yine CT ve TT genotipindeki hipertansif hastalarda, hidroklorotiyazid kullanımı ile kan basıncının daha fazla düştüğünü gözlemlemişlerdir (103). Yamamoto ve arkadaşları ise sistolik kan basıncı artışının T alleli ile ilişkisinden söz etmişlerdir. Diastolik kan basıncı ile bu ilişkiyi gözlememişlerdir (104).

T allel taşıyıcıları ayrıca obezite, hipertrigliseridemi, diabetes mellitus açısından da CC genotipine göre daha fazla riske sahiptir (104). G-proteinlerinin adipogenezde önemli rol oynamaları nedeniyle, T allelinin obezite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (10). GNB3 825T alleli ayrıca Na^+/H^+ değiştirici aktivitesini artırmaktadır ve bu nedenle esansiyel hipertansiyon ve diyabetik nefropati ile ilişkisinin olduğu da düşünülmektedir (10,102). Na^+/H^+ değişimi hücre içi pH'ı, hücre hacmini düzenlemektedir ve aktivitesindeki artış böbrek Na^+ retansiyonu, insülin direnci, vasküler ve ventriküler hipertrofi ile de ilişkilendirilmiştir (9,102). Bu dimorfizm aynı zamanda insanlarda kardiyak potasyum kanal aktivitesinde ve α_2 -adrenoreseptör aracılı vazokonstrüksiyondaki artış ile ilişkilidir (95).

2.8.4. GNB3 Gen Polimorfizmi Ve Kanser İlişkisi

Hücre içi sinyal iletiminin önemli bir bileşeni olan G-proteinlerinin hücre büyümesi ve mitozdaki rolleri nedeniyle tümör büyümesi ve gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (7). *In vitro* pek çok endojen madde G-protein bağlı reseptörlerin

uyarılmasını, mitojenik sinyalleri ve hücre büyümesini tetikler. Bu reseptörler ise mitojenik sinyalleri G-protein alt tiplerini aktifleştirerek iletirler (105). Yapılan bir çalışmada malin prostat örneklerinde sağlam dokuya göre G-protein bağlı reseptörlerin artmış olarak eksprese edildiği görülmüştür. Bu durum G-protein sisteminin prostat kanserinde aktif olduğunu işaret edebilirken, ayrıca kanserin başlangıcı ve ilerlemesi ile de ilişkisi düşünülebilmektedir (105). Çalışmada G $\beta\gamma$ alt birimlerinin kanser hücrelerinin büyüme ve yaşam süreleri üzerinde kritik rol oynadığı bildirilmiştir. Bu sinyal yolağını hedef alan *in vivo* inhibisyon ile tümör büyüme hızında anlamlı azalma olduğu gözlenmiştir (105).

GNB3 geninin T hücre yanıtında artış ve inflamatuvar yanıtla olan ilgisi ve inflamatuvar değişikliklerin kanser oluşumundaki önemi gibi nedenlere bağlı olarak GNB3 C825T gen polimorfizminin ve 825C allelinin kolorektal kanserle ilişkisi olduğu düşünülmektedir (18). Meme kanserlerinde yapılan bir başka çalışmada ise böyle bir ilişkiye rastlanmamıştır (3).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Onkoloji Enstitüsünde histopatolojik olarak özofagus, mide, kolon, rektum ve pankreas kanseri tanısı konulmuş, akraba olmayan 202 hasta (75 kadın ve 127 erkek) ve 191 sağlıklı birey (79 kadın ve 112 erkek) yer almıştır. Hastalık yerlerine göre hastaların dağılımı 13 özofagus, 54 mide, 61 kolon, 50 rektum ve 24 pankreas kanseri şeklindedir. Kontrol grubu oluşturulurken kanser, diyabet, hipertansiyon gibi herhangi bir kronik hastalığı olmayan, tamamen sağlıklı bireyler çalışma grubuna dahil edilmiştir. Hasta grubunun yaş ortalaması ve standart sapması $58,25 \pm 12,72$ olup, yaş aralığı 21-85'dir. Kontrol grubunda ise yaş ortalaması ve standart sapması $49,85 \pm 12,39$ olup, yaş aralığı 19-76'dır.

Polikliniklerde yapılan görüşme ve muayene sonucu çalışmaya alınma kriterlerini karşılayan bireyler çalışmaya davet edilmişler ve kan örneği vermeleri istenmiştir. Bilgilendirilmiş onay işlemi ardından kan örnekleri alınmıştır (EK-1). Gönüllü bireylerden, uygun bilgilendirme işleminden sonra, EDTA'lı tüplere 2 ml kan örnekleri alınmıştır. DNA izolasyonu periferik dolaşımdaki lökositlerden, DNA izolasyon kiti ile yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar analiz edilinceye kadar $+4$ °C'de saklanmıştır.

GNB3 gen genotiplemesinin yapılması için uygun gen bölgesi PCR ile çoğaltılıp, uygun restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Daha sonra elektroforezde yürütülüp elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.1 KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Termal Cycler (Uvigene, Biolab, UK)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Elite 300, Wealtec, Taiwan)
- Elektroforez Tankı (Elite 300, Wealtec, Taiwan)
- Jel Görüntüleme Sistemi (UVI PhotoV.99, Uvitec Ltd, UK)
- Otomatik hematoloji analizörü (Sysmex XT 2000i, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)

- Modular analitik E-170 sistemi (Roche Diagnostic Systems, Basel, Switzerland)
- Mikrosantrifüj (Sigma, 1-15, Germany)
- Spektrofotometre (Varian Cary 50 Bio UV Visible Spectrophotometer, USA)
- Vorteks (Heidolph, Reax top, Germany)
- Mikropipet Seti (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Etüv (Nüve, EN 500, Türkiye)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph, MR 3001, Germany)
- Sıcak su banyosu (Mettler, WB 22, Germany)
- Mikrodalga Fırın (Beko, MD 1500, Türkiye)
- Hassas Terazî (Shimadzu, Ax120, Japan)
- Derin Dondurucu (Bosch, GmbH, KSU-40623, NE)
- Buzdolabı (Bosch, GmbH, KSU-40623, NE)

3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- DNA izolasyon kiti (E.Z.N.A. Blood DNA isolation Kit, Cat No: D3482-01, Omega BioTek, Inc. Doraville, GA, USA)
- EDTA (K91089121 908, Merck, Darmstadt, Germany)
- Trizma Base (T-6066, Sigma, Steinheim, Germany)
- Borik Asit (01.BO.03.1544, EGAŞ eczane gereçleri AŞ, Türkiye)
- Ethidyum Bromid (M58, Ethidium bromide dropper bottle, Olerup, Sweden)
- Yükleme tamponu (R0611, 6X loading dye solution, MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)
- Absolü Etanol (32221, Riedel-de Haen, GmbH&CO, Seelze)
- Agaroz (091629PR, Agarose Basica LE, Prona, European Economic Community)
- Dimetil sulfoksit (DMSO) (D-8779, Sigma, Steinheim, Germany)
- 10xPCR tamponu (NH₄)₂SO₄ ilaveli (4503, MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)
- dNTP Mix (R0241, MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)
- MgCl₂ (1183900, Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany)
- Bidistile Su (W-3500, Sigma, Steinheim, Germany)
- Taq DNA Polimeraz (EPO401, Taq polymerase, MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)

- Primer (Sense, 50613X173G09 13/44, Metabion GmbH, Martinsried, Germany)
- Primer (Antisense, 50613X173G10 14/44, Metabion GmbH, Martinsried, Germany)
- Bse DI (Sec I) Restriksiyon Enzim Seti (ER1081, MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)
- 100 bp DNA standartı (SM0241, Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas Vilnius, Lithuania)

3.1.3 Kullanılan Tampon Çözeltiler

3.1.3.1 DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

DNA izolasyonu için E.Z.N.A. Blood DNA isolation kiti kullanılmıştır. Kit içeriği çizelge 3.1’de verilmiştir. Çizelgede verilen kit içeriği kullanma kılavuzunda verilen bilgiler doğrultusunda aşağıdaki şekilde kullanıma hazırlanmıştır;

- **Proteinaz K;** Kit içerisinde bulunan proteinaz enziminin hazırlanması için liyofilize olarak gelen 70 mg Proteinaz K içerisine 1 ml DNaz ve RNaz içermeyen steril su eklenir, porsiyonlara ayrılarak $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de saklanır.
- **Yıkama Tamponu;** Konsantre haldeki 24 ml’lik tampon içerisine 36 ml absöü etanol eklenmiştir.

Çizelge 3.1: DNA İzolasyonunda Kullanılan Kit İçeriği

Kimyasal adı	Miktarı
BL Tamponu	20 ml
Liyofilize Proteinaz K	70 mg
HB tamponu	30 ml
Yıkama Tamponu	24 ml
Elüsyon Tamponu	30 ml
RNaz A	260µl

3.1.3.2. Elektrophorez İçin Kullanılan özeltiler

10X TBE (Tris–Borat–EDTA) Tamponu (pH=8)

- Tris Base (100 g)
- Borik Asit (55 g)
- 0.5 M Na₂ EDTA (40 ml, pH=8)

Distile su ile 1lt'ye tamamlanır. PH 8'e ayarlanır.

Yürütme Tamponu

- 1X TBE Tamponu (100 ml 10XTBE tamponu, 900 ml distile su ile dilüe edilir.)
- Elektrophorez tankının işaretli seviyesine kadar 1X TBE tamponu konulur.

%2,5 Agaroz Jel özeltisi

- 1X TBE tamponu (150 ml)
- Agaroz (3,75 g)
- Etidyum Bromid (0.5 µg/ml)

100 bp DNA standartı

- 2µl DNA standartı
- 2µl 6X yükleme tamponu
- 8µl distile su,

şeklinde hazırlanarak kullanılır. 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 ve 80 baz çiftlik 11 adet fragman elde edilir.

1X Yükleme Tamponu

- 6X yükleme tamponu, PCR ürünü ile 1:6 oranında karıştırılarak hazırlanır.

BseDI Restriksiyon Enzimi

- 10 Ü/µl konsantrasyonundaki enzim, 1:9 oranında 1X Tango tamponu ile dilüe edilerek kullanılır.

3.2. DNA İZOLASYONU

3.2.1. Prensip

DNA izolasyonu sırasında dönüşümlü nükleik asit bağlama özelliği olan HiBind matrikse sahip mini kolona, özel olarak formüle edilmiş bir tampon sistemi sayesinde, 60 kb'dan daha büyük DNA'ların tutunması sağlanmaktadır. Örnekler öncelikle 42 °C denatürasyon ortamında parçalanmaktadır. Mini kolonlara aktarılan örnek içerisindeki DNA'lar matrikse bağlanırken, hemoglobun, hücresele artıklar ve diğere proteinler, yıkama solüsyonu ile uzaklaştırılmaktadır. Son olarak elüsyon tamponu ile matrikse bağılı olan nükleik asitlerin bu yapıdan ayrılmalari sağlanmakta ve yüksek kalitede DNA elde edilmektedir.

3.2.2. Uygulama

Steril bir ependorf tüpüne 250 µl tam kan alındı ve üzerine 250 µl BL tamponu, 5 µl RNaz A, 20 µl proteinaz K eklendi. Ependorf tüplerinin ağızı kapatılıp iyice karıştırıldı ve sıcak su banyosunda 45 °C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından üzerine 260 µl %100 etanol eklenip iyice karıştırıldı. Karışım filtre tüpüne aktarılıp 1 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildikten sonra toplama tüpü değiştirildi ve filtre tüpüne 500 µl HB tampon eklenip 1 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpü tekrar değiştirilip filtre tüpüne 650 µl yıkama tamponu eklendi ve 1 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Yıkama tamponunun tamamen ortamdandan uzaklaştırılması için toplama tüpünün içeriği boşaltılıp tekrar 10000 rpm'de 1 dakika daha santrifüj edildi. Filtre tüpü yeni bir ependorf tüpüne alındı ve izolasyona başlamadan önce 70 °C'ye bırakılmış olan elüsyon tamponundan filtre tüpüne 100 µl eklendi. 1 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi. Filtre tüpüne yeniden 100 µl elüsyon tamponu eklendi, 1 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi ve sonra filtre tüpü atıldı. Elüsyon tamponu DNA'nın filtreden çözünmesini sağladığından hedef DNA da tampon ile birlikte ependorf tüpüne alınmış oldu. Her elüsyon aşaması %60–70 oranında DNA'yı mini kolondan ayırmaktadır. Toplam elüsyon tampon miktarını ikiye bölerek elüsyon aşamasını iki kere tekrarlamak suretiyle bu oranın en az %90'a çıkarılması sağlanmış oldu.

3.2.3. DNA Kalite ve Verimliliğinin Test Edilmesi;

Elde edilen DNA'nın miktarını tespit etmek için spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmaktadır. Distile su kör olarak kullanılarak, Tris-EDTA tamponunda dilüe edilen DNA'ların absorbansları ölçüldü. DNA'nın kalitesi, hem 260 nm, hem de 280 nm de absorbans ölçümü sonucu tespit edildi. Absorbansların oranının (A_{260}/A_{280}) 1.7 ve 1.9 arasında olması DNA'nın %85–95 saflıkta olduğunu göstermekteydi.

Konsantrasyon hesabı ise aşağıdaki formül kullanılarak yapıldı.

$$[DNA] = (\text{Absorbans}_{260}) \times (0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}) \times (\text{sulandırma etkeni})$$

E.Z.N.A. Blood DNA isolation kiti (Omega Biotek, Doraville, GA, USA) kullanılarak izole edilen DNA'ların miktarı her 250 μl örnek için 4–12 μg DNA idi.

3.3. MOLEKÜLER ANALİZ

3.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulaması

GNB3 gen amplifikasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR, Polymerase Chain Reaction) yöntemiyle *F* 5'- *TGACCCACTTGCCACCCGTGC* -3' ve *R* 5'- *GCAGCAGCCAGGGCTGGC* -3' primerleri kullanılarak yapıldı.

PCR ortamı her bir örnek için; final konsantrasyon 50 ng genomik DNA, 200 μM dNTP karışımı, 10 pmol primer (her birinden), 2,4 mM MgCl_2 , 1x PCR tamponu ve 0,5 U Taq polimeraz olacak şekilde hazırlandı (106). Amplifikasyon, otomatik bir thermal cyclus kullanılarak gerçekleştirildi. PCR koşulları şu şekilde sağlandı (107):

94 °C	5 dakika	1 Döngü	İlk Denatürasyon
94 °C	1 dakika	} 35 Döngü	Denatürasyon
64 °C	1 dakika		Primer Bağlanma-Annealing
72 °C	1 dakika		Uzama-Extension
72 °C	7 dakika	1 Döngü	Son Uzama-Final Extension

Amplifikasyon ürününün elektroforez işlemi sonrasındaki görünümünün yeterli olmadığı belirlendi ve önceki PCR koşulları kendi laboratuvar koşullarımıza uygun olarak modifiye edildi. PCR ortamı her bir örnek için; final konsantrasyon 100 ng genomik DNA, 200 μM dNTP karışımı, 7,5 pmol primer (her birinden), 3,75 mM MgCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilaveli 1x PCR tamponu, %12 DMSO ve 2 U Taq polimerase olacak

şekilde 25 µl'lik reaksiyon hacminde tekrar hazırlandı. PCR ürünleri RFLP ve elektroforez işlemlerinde kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

3.3.2. Elektroforez İşlemi

PCR işlemi sonrasında, GNB3 geninin amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için ve amplifiye olan gen bölgesinin uzunluğunu belirlemek için agaroz jel elektroforez işlemi uygulandı.

PCR işlemi sonunda amplifiye edilen gen bölgesinin uzunluğu 268 baz çifti (bp) olduğundan RFLP yapılmadan önce tek bir bant gözlenmesi bekleniyordu (94). Bunu belirlemek için % 2,5'luk agaroz jel hazırlandı. Hazırlanan agaroz jel taraklarını eritmeyecek ısıya düşmesini sağlamak için, manyetik karıştırıcıda uygun ısıya düşene kadar karıştırıldı. Karıştırma esnasında jel içerisine final konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde EtBr eklendi. Jel uygun ısıya düşünce jel kalıbına döküldü ve jel tarakları yerleştirilerek katılaştırılması bekledi. Yaklaşık 1-2 saat sonunda jel tamamen katılaştıktan sonra jele gömülü taraklar çıkarıldı ve jel ikiye bölünerek bir tanesi elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının içine yerleştirilen jelin üst kısmı tamamen tampon ile örtülünceye kadar elektroforez tankı yürütme tamponu ile dolduruldu.

PCR örneklerinin üzerine 1/6 oranında 6X boya yükleme solüsyonu eklendikten sonra santrifüjlendi ve iyice karışması sağlanan örneklerin her biri otomatik pipet yardımıyla kuyucuklara yüklendi.

Elde edilen bandın uzunluğunu tespit etmek amacıyla 12 µl 100 bp'lik marker (100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas Vilnius, Lithuania) kullanıldı. Örnekler 120 voltluk akım uygulanarak 30 dakika yürütüldü. Elde edilen DNA bantları jel görüntüleme sistemi yardımıyla (UVIPhotoV.99, Uvitec Ltd, UK) görüntülendi. Gözlenen bantların moleküler uzunluğu, DNA standartı ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi. Elde edilen görüntü kaydedilerek saklandı.

3.3.3. Restriksiyon Enzimi Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) İşlemi

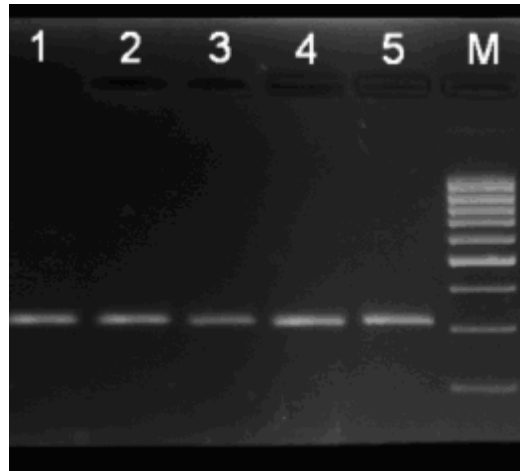
GNB3 geninin 825. nükleotidinde meydana gelen sitozin timin değişim polimorfizmi, Bse DI restriksiyon enzimi kullanılarak belirlenmiştir. RFLP işlemi için elde edilen PCR ürünleri bir gece boyunca (yaklaşık 16 saat) 55 °C'de 1 Ünite Bse DI ile inkübasyona tabi tutuldu (95). İnkübasyon sonrası ürünleri 0,5 µg/ml ethidium

bromid içeren yukarıda anlatılan şekilde hazırlanmış % 2,5'luk agaroz jelde 120 volt'da 40 dakika yürütüldü.

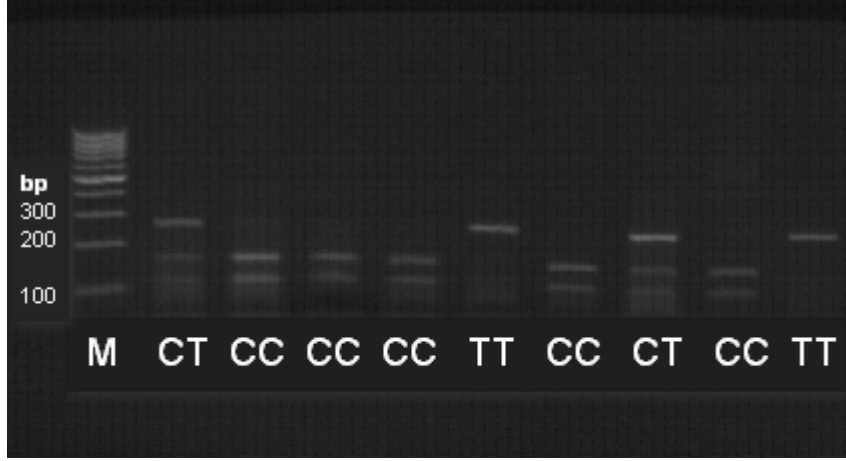
3.3.4.Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm değerlendirmelerde 100 bp'lik DNA standartı (100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas Vilnius, Lithuania) kullanıldı. Gözlenen bantların moleküler uzunlukları, bu standart ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi (± 10 bp). Örnekler, UV ışık altında jel görüntüleme sistemi ile görüntülenerek değerlendirildi (Şekil 3.1).

Bse DI ile inkübasyon sonucunda; TT genotipine sahip bireyler için 268 bp'lik tek bir bant (kesilmeye uğramamış), CC genotipine sahip bireyler için 116 bp, ve 152 bp'lik iki bant (tam kesilmeye uğramış) ve CT genotipine sahip bireyler için ise 116 bp, 152 bp, 268 bp'lik üç bant gözlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.1: PCR sonrasında 268 bp'lik GNB3 geni fragmanlarının agaroz jel (%2.5) elektroforezindeki görünümü. (M: DNA standartı)



Şekil 3.2: GNB3 geni PCR ürününün, BseDI restriksiyon enzimi ile kesiminden elde edilen sonuçlar (%2.5'lük agaroz jel elektroforezi). 100 bp DNA standartı (M) ve bazı bireyler'e ait genotipler gösterilmiştir.

3.4. Lenfosit ve Tümör Belirteçlerinin Analizi

Lenfosit düzeyleri, EDTA içeren tüplere alınan kanların hemogram cihazında (Sysmex XT 2000i, Roche Diagnostics) yapılan analizi ile belirlenmiştir. Düz biyokimya tüpüne alınan ve daha sonra serumları ayrılan örneklerin tümör belirteç (CA 19-9, CEA) düzeylerinin analizi ise Modular E-170 (Roche Diagnostics) cihazında yapılmıştır.

3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS, version 11,5) kullanılarak yapılmıştır. Yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi gibi demografik veriler için student t test, ki-kare, tek yönlü varyans analizi testleri uygulamıştır. GNB3 gen polimorfizmi ile gastrointestinal kanser arasındaki ilişki (Odds oranı (OR) ve % 95 güven aralığı) logistik regresyon analizi ile incelenmiştir. Genotipler, alleller ile ilgili analizlerde ki-kare testinden yararlanılmıştır. Yaşam süresi analizlerinde Kaplan Meier testi kullanılmıştır. Örneklerin Hardy-Weinberg dengesine uyumluluğu Hardy-Weinberg testi ile analiz edilmiştir. Sonuçlardan elde edilen anlamlılık ($p = \text{significance}$) değerleri iki yönlü olarak değerlendirilmiştir. p değerinin 0.05'den küçük olması, istatistiksel olarak anlamlı şekilde kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Gastrointestinal kanser ile G-protein GNB3 C825T gen polimorfizm arasındaki ilişkinin araştırıldığı bu çalışmada araştırma popülasyonumuz; yaşları 21 ile 85 arasında değişen 202 gastrointestinal kanser hastası ve yaşları 19 ile 76 arasında değişen 191 kişilik kontrol grubundan oluşmaktadır. Gastrointestinal kanserli hastalara ait kan örneklerinin 132'si Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalına ve 70'i İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Onkoloji Enstitüsüne başvuran hastalardan sağlanmıştır. Kontrol grubu örneklerinin de 70'i İstanbul Üniversitesi, geri kalan 121'i de Mersin Üniversitesinden alınmıştır. Farklı coğrafik bölgelerden alınan örneklerdeki olası etnik farklılıkların genotipik dağılımları etkileyebileceği öngörüsü ile yapılan analizde İstanbul ve Mersin'den çalışmaya alınan örnekler arasında genotipik açıdan fark olmadığı izlenmiştir ($p>0,05$). Hasta grubundaki bireylerin hastalık yerlerine göre dağılımı 13 özofagus, 54 mide, 111 kolorektal (61 kolon ve 50 rektum) ve 24 pankreas kanseri şeklindedir. Histolojik tiplere göre hastaların dağılımı ise şu şekildedir; Kolorektal kanserli hastalarda 107 adenokanser, 3 müsinöz kanser ve 1 skuamöz hücreli kanser izlenmiştir. Mide kanserli hastalarda 52 adenokanser ve 2 skuamöz hücreli kanser izlenirken, özofagus kanserli hastalarda 9 skuamöz hücreli kanser ve 4 adenokanser görülmüştür. Pankreas kanserli hastaların tümünde duktal adenokanser saptanmıştır.

Bu bireylerden izole elde edilen DNA'lerden PCR-RFLP yöntemi ile GNB3 geninin 825. nükleotidindeki C→T değişimine bağlı olarak allel ve genotipleri belirlenmiştir.

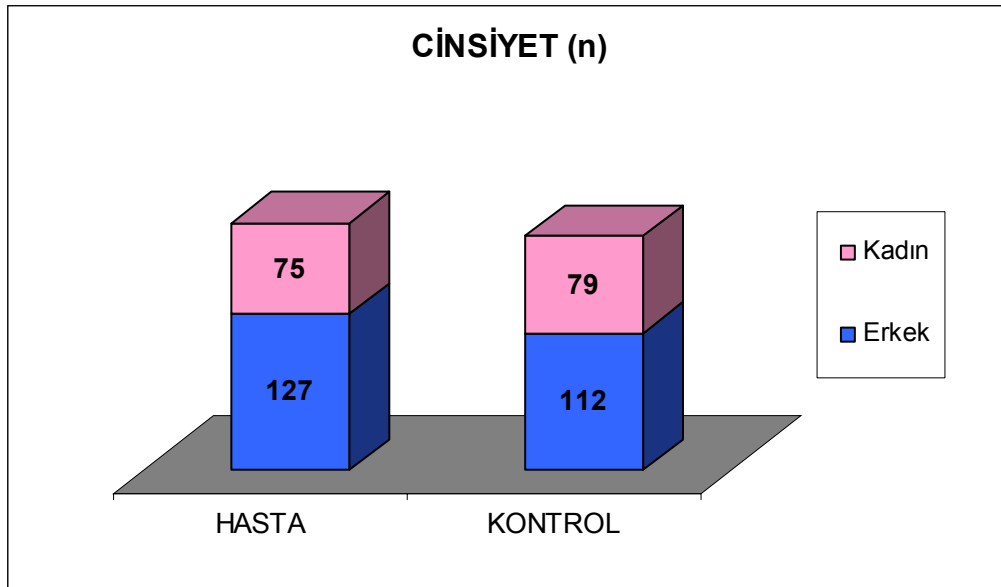
4.1. Hardy-Weinberg Dengesi

Hardy-Weinberg dengesi gözlenen genotip sıklıklarının beklenen değerler ile uyum içinde olup olmadıklarını incelemektedir. Çalışmanın başlangıcında sağlıklı kontrol grubunun genotip dağılımının Hardy-Weinberg dengesine uyumluluğu test edilmiştir. Kontrol grubunun genotip dağılımının dengede olduğu tesbit edilmiştir ($p=0,895$). Kontrol grubunda T allel frekansı %34,29 olarak bulunmuştur. Benzer şekilde tümör grubunda da genotip dağılımı Hardy-Weinberg dengesi ile uyumludur ($p=0,996$).

4.2. Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyet, yaş ve vücut kitle indeksleri açısından değerlendirilmesi

İstatistiksel analize ilk olarak kontrol ve hasta gruplarının cinsiyet, yaş ve vücut kitle indeksleri açısından değerlendirilmesi ile başlanmıştır. Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi hasta grubunun yaş ortalaması $58,25 \pm 12,72$ ve kontrol grubunun yaş ortalaması ise $49,85 \pm 12,39$ ’dur. Student t test analizi sonucunda hasta grubu ve kontrol grubu arasında yaş değişkeni bakımından fark bulunmuştur ($p=0.000$). Gruplar arasında fark olmasına rağmen her iki grup da orta yaş sınıfında (45- 64 yaş arası) yer almaktadır (108). Çalışmanın kontrol grubuna, kanser, diyabet, hipertansiyon gibi herhangi bir kronik hastalığı olmayan, tamamen sağlıklı bireyler dahil edildiği, ve kronik hastalığı olanlar çalışma grubu dışında bırakıldığı için hasta-kontrol grubu arasında yaş bakımından fark bulunmuştur. Bu farklılık bize gastrointestinal kanserlerin daha geç yaşlarda ortaya çıktığını göstermektedir.

Hasta grubunda 75 kadın ve 127 erkek birey mevcut iken kontrol grubunda 79 kadın ve 112 erkek bulunmaktadır. (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet açısından dağılımı (n: Gruplardaki birey sayısı)

Ki-kare testi uygulandığında hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyet bakımından anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p= 0,390$). Demografik verilere göre hasta ve kontrol örnekleri cinsiyet bakımından homojendir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1: Hasta ve kontrol grubunun yaş ortalaması ve cinsiyet açısından dağılımı

	Kontrol	Hasta	P değeri
Toplam (n)	191 (%100)	202 (%100)	
Yaş, Ortalama \pm SD	49,85 \pm 12,39	58,25 \pm 12,72	p = 0,000
Cinsiyet			
Kadın (n)	79 (%41,4)	75 (%37,1)	p = 0,390
Erkek (n)	112 (%58,6)	127 (%62,9)	

n: Gruplardaki birey sayısı , SD: Standart sapma

Hasta grubunun, hastalık yerlerine göre yaş ortalaması ve cinsiyet bakımından dağılımı çizelge 4.2’de verilmiştir. Ki-kare testi kontrol grubu ve hastalık yerlerine göre ayrılan hasta grupları arasında cinsiyet bakımından istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır (p = 0,438). Tek yönlü varyans analizi ile kontrol grubu ve hastalık yerlerine göre ayrılan hasta grupları arasında yaş değişkeni bakımından fark bulunmuştur (p = 0,000).

Çizelge 4.2: Hastalık yerlerine göre hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalaması ve cinsiyet açısından dağılımı

	Kontrol	Kolon	Mide	Özofagus	Pankreas	Rektum	P değeri
Toplam(n)	191	61	54	13	24	50	
Yaş, Ortalama \pm SD	49,85 \pm 12,39	57,73 \pm 13,35	55,37 \pm 12,67	53,54 \pm 13,00	61,21 \pm 9,51	61,78 \pm 12,48	p = 0,000
Cinsiyet							
Kadın (n)	79 (%41,4)	18 (%29,5)	22 (%40,7)	5 (%38,5)	7 (%29,2)	23 (%46)	p = 0,438
Erkek (n)	112 (%58,6)	43 (%70,5)	32 (%59,3)	8 (%61,5)	17 (%70,8)	27 (%54)	

n: Gruplardaki birey sayısı , SD: Standart sapma

Kontrol grubunda yaş ortalaması 49,85 \pm 12,39 iken, özofagus kanseri 53,5 yaş civarında yani diğer kanserlerden daha erken izlenmektedir. Pankreas ve rektum kanserleri ise 61 yaş civarında görülmektedir.

Çalışma grupları vücut kitle indeksi (BMI= body mass index) bakımından incelendiğinde hasta grubunun BMI ortalama ve standart sapması $23,32 \pm 3,35$ ve kontrol grubunun ise $25,08 \pm 3,93$ 'dur. Student t test analizi sonucunda hasta grubu ve kontrol grubu arasında vücut kitle indeksi değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.000$). Bu sonuca göre gastrointestinal kanserli hastalarda vücut kitle indeksi daha düşüktür. Yine hasta grubunun, hastalık yerlerine göre vücut kitle indeksleri bakımından dağılımı çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3: Hastalık yerlerine göre hasta ve kontrol gruplarının vücut kitle indeksi dağılımı

	Kontrol	Kolon	Mide	Özofagus	Pankreas	Rektum	P değeri
BMI,	25,08	23,50	22,63	21,85	22,82	24,49	p = 0,000
Ortalama	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	
\pm SD	3,93	3,02	3,65	4,14	3,59	2,73	

SD: Standart sapma

Tek yönlü varyans analizi ile kontrol grubu ve hastalık yerlerine göre ayrılan hasta grupları arasında vücut kitle indeksi bakımından fark bulunmuştur ($p = 0,000$). Bu farkın nedeni, hastalık seyrinde görülen kilo kaybı, beslenme bozukluğu ve alınan tedavilerden etkilenen kilo kaybından kaynaklanmaktadır. BMI'ndeki azalma en fazla özofagus kanserinde izlenirken, en az rektum kanserinde görülmektedir.

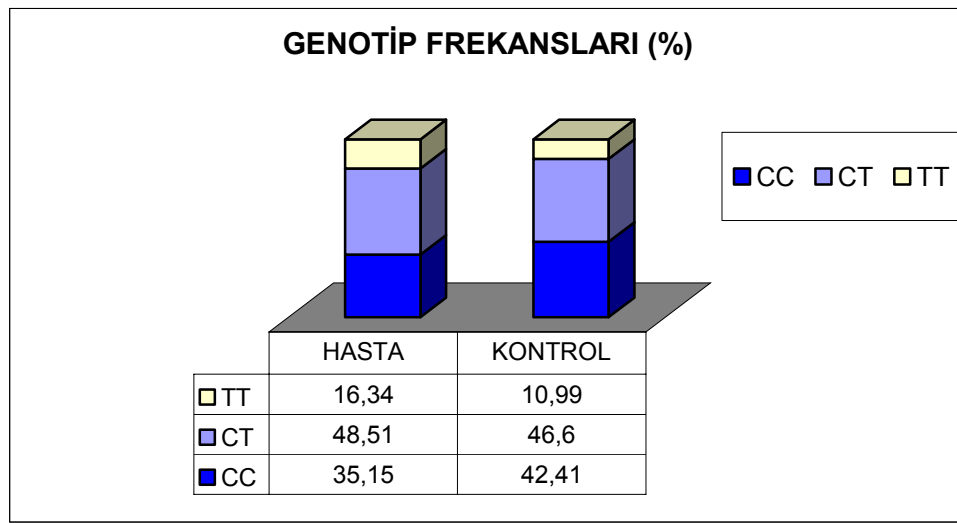
4.3. Kontrol ve hasta gruplarının genotipik açıdan değerlendirilmesi

PCR ile GNB3 geninin 825. nükleotidi içeren bölgesi amplifiye edildikten sonra RFLP kesiminden önce, doğru genin amplifiye edilip edilmediğini kontrol etmek amacıyla % 2,5'lük agaroz jel kullanılarak elektroforez yapıldı. Bazı örnek bireylere ait sonuçlar şekil 3.1'de gösterilmiştir.

GNB3 geninin 825. nükleotidindeki C→T değişimini saptamak için, PCR ile amplifiye edilen her bir örneğe Bse DI enzimi kullanılarak RFLP analizi yapıldı. Hasta grubuna ait 202 birey ve kontrol grubuna ait 191 birey olmak üzere toplam 393 bireyin GNB3 geninin C825T polimorfizmi belirlendi. Bse DI enzimi ile kesilme sonucunda; TT genotipine sahip bireyler için 268 bp'lik tek bir bant (kesilmeye uğramamış), CC genotipine sahip bireyler için 116 bp, ve 152 bp'lik iki bant (tam kesilmeye uğramış) ve

CT genotipine sahip bireyler için ise 116 bp, 152 bp, 268 bp'lik üç bant gözlenmiştir. (Şekil 3.2).

Bu çalışma sonucunda gastrointestinal kanserli 202 bireyden, 71 bireyin CC (% 35,15), 98 bireyin CT (% 48,51) ve 33 bireyin TT (% 16,34) genotipinde olduğu saptandı. Kontrol grubunda ise toplam 191 bireyden, 81 bireyin CC (% 42,41), 89 bireyin CT (% 46,6) ve 21 bireyin ise TT (% 10,99) genotipinde olduğu saptandı. GNB3 C825T gen polimorfizmine ait hasta ve kontrol gruplarının genotiplere göre dağılımı ve Odds oranları şekil 4.2 ve çizelge 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.2: GNB3 C825T Polimorfizmi genotip frekansları.

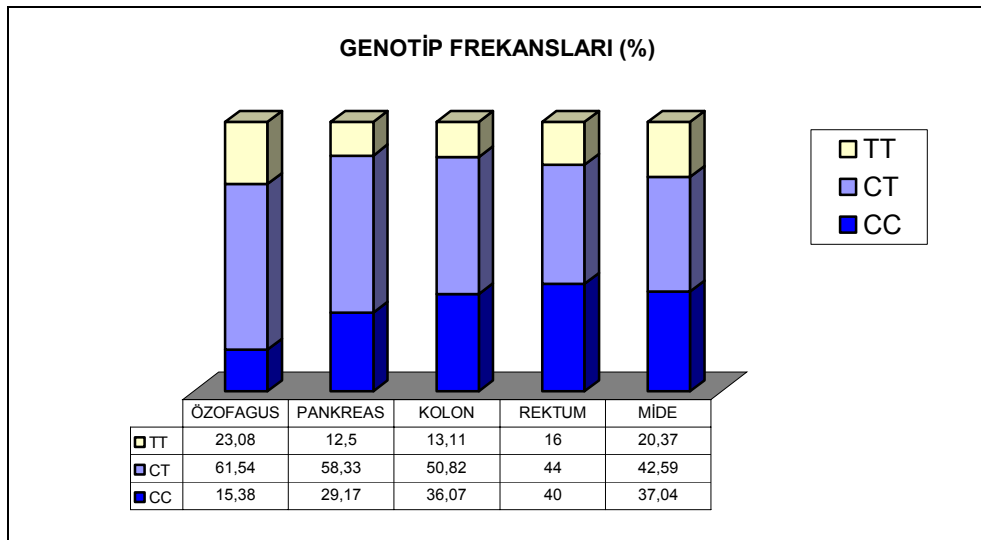
Çizelge 4.4: GNB3 C825T Polimorfizmi genotip dağılımları ve odds oranları

GNB3 C825T Polimorfizmi	Gastrointestinal		P değeri	Odds Oranları (% 95 Güven Aralığı)
	Kontrol (n=191) Sayı (Yüzde)	Kanser (n=202) Sayı (Yüzde)		
CC	81 (%42,41)	71 (%35,15)		1 (referans)
CT	89 (%46,60)	98 (%48,51)	0,076	1,780 (0,941 – 3,370)
TT	21 (%10,99)	33 (%16,34)	0,335	1,238 (0,803- 1,906)

n: Toplam birey sayısı

Bu polimorfizm genotip açısından lojistik regresyon modeli ile incelenmiş ve CC genotipi referans alınarak CT ve TT genotiplerinin hastalıkla ilgili risk oranları hesaplanmıştır. Buna göre CT genotipi, CC genotipine sahip bireylere göre gastrointestinal kanser açısından 1,780 kat risk taşımaktadır ($p= 0,076$). TT genotipi ise 1,238 kat riske sahiptir ($p= 0,335$). İstatistiksel analiz sonucunda genotip frekansında anlamlı bir değişimin olmadığına yani tüm genotiplerin hastalık riski açısından farklı olmadığına % 95 güvenle karar verilmiştir.

GNB3 C825T gen polimorfizmine ait hasta ve kontrol gruplarının hastalık yerlerine göre ayrı ayrı genotip dağılımları şekil 4.3’de grafik şeklinde verilmiştir.



Şekil 4.3: GNB3 C825T Polimorfizminin hastalık yerlerine göre ayrılmış genotip frekansları.

Genotip frekansları ve Odds oranları, hastalık yerlerine göre ayrı ayrı hesaplandığında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çizelge 4.5’de verilen sonuçlar elde edilmiştir. Hastalık yerleri mide, kolorektal, özofagus ve pankreas şeklinde kabul edilmiştir. Lojistik regresyon analizi sonucunda hastalık yerlerinin farklılığına rağmen genotip frekansında anlamlı bir değişimin olmadığına yani tüm genotiplerin hastalık riski açısından farklı olmadığına karar verilmiştir. Anlamlılık (p) değerleri çizelge 4.5’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.5: Hastalık yerlerine göre GNB3 C825T Polimorfizmi genotip dağılımları ve odds oranları

Hastalık Yeri	GNB3 C825T Polimorfizmi	Kontrol (n=191) Sayı (Yüzde)	Hasta Sayı (Yüzde)	P değeri	Odds Oranları (% 95 Güven Aralığı)
Mide (n=54)	CC	81 (%42,41)	20 (%37)	0,955	1 (referans)
	CT	89 (%46,60)	23 (%42,6)		1,020 (0,518 – 2,005)
	TT	21 (%10,99)	11 (%20,4)		0,088 (0,892- 5,224)
Kolorektal (n=111)	CC	81 (%42,41)	42 (%37,8)	0,548	1 (referans)
	CT	89 (%46,60)	53 (%47,7)		1,169 (0,702– 1,947)
	TT	21 (%10,99)	16 (%14,4)		0,267 (0,720 – 3,268)
Özofagus (n=13)	CC	81 (%42,41)	2 (%15,4)	0,099	1 (referans)
	CT	89 (%46,60)	8 (%61,5)		3,807 (0,777 – 18,644)
	TT	21 (%10,99)	3 (%23,1)		0,084 (0,801 – 34,078)
Pankreas (n=24)	CC	81 (%42,41)	7 (%29,2)	0,351	1 (referans)
	CT	89 (%46,60)	14 (%58,3)		1,602 (0,595 – 4,316)
	TT	21 (%10,99)	3 (%12,5)		0,605 (0,326 – 6,825)

İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte özofagus kanserinde CC genotipine göre, CT genotipinin hastalık riskini 3,807 kat, TT genotipinin ise 5,226 kat artırdığı izlenmiştir.

4.4. Hasta ve kontrol gruplarının risk etkenleri açısından değerlendirilmesi

Genotipik farklılıkların dışında hasta ve kontrol grupları kanser hastalığında risk oluşturduğu düşünülen sigara ve alkol kullanımı ve aile öyküsü açısından da incelenmiştir. Lojistik regresyon analizi sonrasında elde edilen veriler çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6: Hasta ve kontrol gruplarındaki aile öyküsü, alkol ve sigara kullanımı ve risk oranları

		Kontrol (n=191)	Gastrointestinal Kanser (n=202)	P değeri	Odds Oranları (% 95 Güven Aralığı)
		Sayı (Yüzde)	Sayı (Yüzde)		
Aile Öyküsü	Var	47 (%24,6)	38 (%18,8)	0,182	0,718 (0,442 – 1,168)
	Yok	144 (%75,4)	164 (%81,2)		1 (referans)
Sigara	Var	60 (%31,4)	64 (%31,7)	0,709	0,913 (0,568 – 1,469)
	Yok	131 (%68,6)	138 (%68,3)		1 (referans)
Alkol	Var	11 (%8,4)	22 (%10,9)	0,496	1,301 (0,610 – 2,773)
	Yok	175 (%91,6)	180 (%89,1)		1 (referans)

Çizelgede belirtildiği gibi gastrointestinal kanser hastalarında aile öyküsü, sigara ve alkol kullanımı gibi risk etkenlerinin hastalık riski açısından kontrol grubu ile farklı olmadığı anlaşılmıştır.

Hastalık yerlerine göre hastalıkla ilgili olabileceği düşünülen, genotip dışı, risk etkenleri ayrı ayrı incelendiğinde ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında alınan lojistik regresyon sonuçları çizelgeler halinde verilmiştir (Çizelge 4.7, 4.8, 4.9, ve 4.10).

Çizelge 4.7: Mide kanserli hasta ve kontrol gruplarındaki aile öyküsü, alkol ve sigara kullanımı ve risk oranları

		Kontrol (n=191)	Mide Kanseri (n=54)	P değeri	Odds Oranları (% 95 Güven Aralığı)
		Sayı (Yüzde)	Sayı (Yüzde)		
Aile Öyküsü	Var	47 (%24,6)	10 (%18,5)	0,289	0,657 (0,303 – 1,428)
	Yok	144 (%75,4)	44 (%81,5)		1 (referans)
Sigara	Var	60 (%31,4)	19 (%35,2)	0,648	1,179 (0,581 – 2,392)
	Yok	131 (%68,6)	35 (%64,8)		1 (referans)
Alkol	Var	11 (%8,4)	6 (%11,1)	0,713	1,229 (0,411 – 3,672)
	Yok	175 (%91,6)	48 (%88,9)		1 (referans)

Çizelge 4.8: Kolorektal kanserli hasta ve kontrol gruplarındaki aile öyküsü, alkol ve sigara kullanımı ve risk oranları

		Kontrol (n=191)	Kolorektal Kanser (n=111)	P değeri	Odds Oranları (% 95 Güven Aralığı)
		Sayı (Yüzde)	Sayı (Yüzde)		
Aile Öyküsü	Var	47 (%24,6)	20 (%18)	0,170	0,663 (0,368 – 1,193)
	Yok	144 (%75,4)	91 (%82)		1 (referans)
Sigara	Var	60 (%31,4)	31 (%27,9)	0,646	0,877 (0,502 – 1,534)
	Yok	131 (%68,6)	80 (%72,1)		1 (referans)
Alkol	Var	11 (%8,4)	7 (%6,3)	0,588	0,758 (0,279 – 2,061)
	Yok	175 (%91,6)	104 (%93,7)		1 (referans)

Çizelge 4.9: Özofagus kanserli hasta ve kontrol gruplarındaki aile öyküsü, alkol ve sigara kullanımı ve risk oranları

		Kontrol	Özofagus	P	Odds Oranları
		(n=191)	Kanseri		
		Sayı (Yüzde)	Sayı (Yüzde)	değeri	(% 95 Güven Aralığı)
Aile Öyküsü	Var	47 (%24,6)	6 (%46,2)	0,096	2,707 (0,838 – 8,738)
	Yok	144 (%75,4)	7 (%53,8)		1 (referans)
Sigara	Var	60 (%31,4)	3 (%23,1)	0,425	0,542 (0,120 – 2,440)
	Yok	131 (%68,6)	10 (%76,9)		1 (referans)
Alkol	Var	11 (%8,4)	1 (%7,7)	0,881	1,200 (0,111 – 12,966)
	Yok	175 (%91,6)	12 (%92,3)		1 (referans)

Çizelge 4.10: Pankreas kanserli hasta ve kontrol gruplarındaki aile öyküsü, alkol ve sigara kullanımı ve risk oranları

		Kontrol	Pankreas	P	Odds Oranları
		(n=191)	Kanseri		
		Sayı (Yüzde)	Sayı (Yüzde)	değeri	(% 95 Güven Aralığı)
Aile Öyküsü	Var	47 (%24,6)	2 (%8,3)	0,116	0,296 (0,065 – 1,353)
	Yok	144 (%75,4)	22 (%91,7)		1 (referans)
Sigara	Var	60 (%31,4)	11 (%45,8)	0,995	1,004 (0,338 – 2,979)
	Yok	131 (%68,6)	13 (%54,2)		1 (referans)
Alkol	Var	11 (%8,4)	8 (%33,3)	0,009	5,092 (1,509 – 17,181)
	Yok	175 (%91,6)	16 (%66,7)		1 (referans)

Gastrointestinal kanserli hastalar, hastalık yerlerine göre değerlendirildiğinde mide, kolorektal ve özofagus kanserlerinde aile öyküsü, sigara ve alkol kullanımı gibi risk etkenlerinin hastalığa yatkınlık açısından bir risk oluşturmadığı izlenmiştir. Pankreas kanserinde ise aile öyküsü ve sigara kullanımı riske neden olmazken, alkol kullanımının kanser riskini 5,092 kat arttırdığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p= 0,009$).

4.5. Hasta ve kontrol gruplarının CC/ CT+TT genotip dağılımı açısından değerlendirilmesi

GNB3 geni C825T polimorfizmi genotip açısından lojistik regresyon modeli ile incelenmiş ve CC genotipi referans alınarak bu genotipe karşı bir veya iki adet T alleli taşıyan bireylerin yani CT+TT genotiplerinin toplamının hastalıkla ilişkisi ve risk oranları incelenmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11: GNB3 C825T Polimorfizmi CC ve CT+TT şeklindeki genotip dağılımları ve odds oranları

GNB3 C825T Polimorfizmi	Kontrol (n=191) Sayı (Yüzde)	Gastrointestinal Kanser (n=202) Sayı (Yüzde)	P değeri	Odds Oranları (% 95 Güven Aralığı)
CC	81 (%42,41)	71 (%35,15)		1 (referans)
CT + TT	110 (%57,6)	131 (%64,9)	0,163	1,340 (0,888 – 2,023)

Çizelge 4.11’de verilen sonuçlara göre, CT + TT genotiplerine sahip bireyler, CC genotipine göre gastrointestinal kanser açısından 1,340 kat risk taşımaktadır ($p= 0,163$). İstatistiksel analiz sonucunda genotip frekansında anlamlı bir değişimin olmadığına yani tüm genotiplerin hastalık riski taşımak açısından farklı olmadığına karar verilmiştir.

Çalışma grupları CC ve CT+TT şeklinde düzenlendiğinde, risk etkenleriyle ilgili analizler tekrarlanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aile öyküsü ($p= 187$, Odds oranı(%95 güven aralığı)= 0,721 (0,444 - 1,172)), sigara kullanımı ($p= 726$, Odds oranı(%95 güven aralığı)= 0,919 (0,572 - 1,476)) ve alkol kullanımının ($p= 498$, Odds

oranı(%95 güven aralığı)= 1,298 (0,611- 2,760)) gastrointestinal hastalıkla ilgili bir risk taşımadığına karar verilmiştir. Farklı hastalık yerlerine göre ayrılarak analiz yapıldığında ise çizelge 4.12'deki sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.12: Hastalık yerlerine göre CC ve CT+TT şeklinde genotip dağılımları ve odds oranları

Hastalık Yeri	GNB3 C825T Polimorfizmi	Kontrol (n=191) Sayı (Yüzde)	Hasta Sayı (Yüzde)	P değeri	Odds Oranları (% 95 Güven Aralığı)
Mide (n=54)	CC	81 (%42,41)	20 (%37)	0,512	1 (referans)
	CT+TT	110 (%57,6)	34 (%63)		1,234 (0,659 – 2,309)
Kolorektal (n=111)	CC	81 (%42,41)	42 (%37,8)	0,387	1 (referans)
	CT+TT	110 (%57,6)	69 (%62,2)		1,238 (0,763 – 2,009)
Özofagus (n=13)	CC	81 (%42,41)	2 (%15,4)	0,073	1 (referans)
	CT+TT	110 (%57,6)	11 (%84,6)		4,107 (0,877 – 19,230)
Pankreas (n=24)	CC	81 (%42,41)	7 (%29,2)	0,348	1 (referans)
	CT+TT	110 (%57,6)	17 (%70,8)		1,582 (0,607 – 4,128)

Çizelge 4.12'de verilen sonuçlara göre, farklı hastalık yerlerine göre ayrıldığında da CT + TT genotiplerine sahip bireyler, CC genotipine göre kanser açısından risk taşımamaktadır. İstatistiksel analiz sonucunda genotip frekansında anlamlı bir değişimin olmadığına yani tüm genotiplerin hastalık riski taşımak açısından farklı olmadığına karar verilmiştir.

Farklı hastalık yerlerine göre ayrılmış çalışma grupları, CC ve CT+TT şeklinde düzenlenerek risk etkenleriyle ilgili analizler tekrarlanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aile öyküsü, sigara kullanımı ve alkol kullanımının mide, kolorektal,

özofagus kanseri ile ilgili bir risk taşımadığına karar verilmiştir. Sadece alkol kullanımının pankreas kanserinde hastalık riskini 5,051 kat artırdığı (0,607- 4,128) izlenmiştir (p= 0,008).

4.6. Hasta ve kontrol gruplarının genotip, cinsiyet, vücut kitle indeksi açısından değerlendirilmesi

Kontrol grubu ve gastrointestinal kanserli hastalarda cinsiyet ve genotipler arasındaki ilişki ki-kare testi ile incelendiğinde çizelge 4.13'deki sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.13: Hasta ve kontrol grubunun genotip ve cinsiyet açısından dağılımı

	Genotip	Kontrol Sayı (Yüzde)	Hasta Sayı (Yüzde)
Kadın	CC	30 (%37)	33 (%46,5)
	CT	43 (%48,3)	35 (%35,7)
	TT	6 (%28,6)	7 (%21,2)
Erkek	CC	51 (%63)	38 (%53,5)
	CT	46 (%51,7)	63 (%64,3)
	TT	15 (%17,4)	26 (%28,8)
P değeri		0,148	0,042

Ki-kare analizi ile kontrol grubunda genotipler ve cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir (p= 0,148). Hasta grubunda ise genotipler ve cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (p= 0,042). Bu sonuca göre gastrointestinal kanserli erkeklerde CT/TT genotipleri daha sık görülmektedir.

Kontrol grubu ve gastrointestinal kanserli hastalarda vücut kitle indeksi (BMI) ve genotipler arasındaki ilişki anova testi ile incelendiğinde ise çizelge 4.14'deki sonuçlar elde edilmiştir.

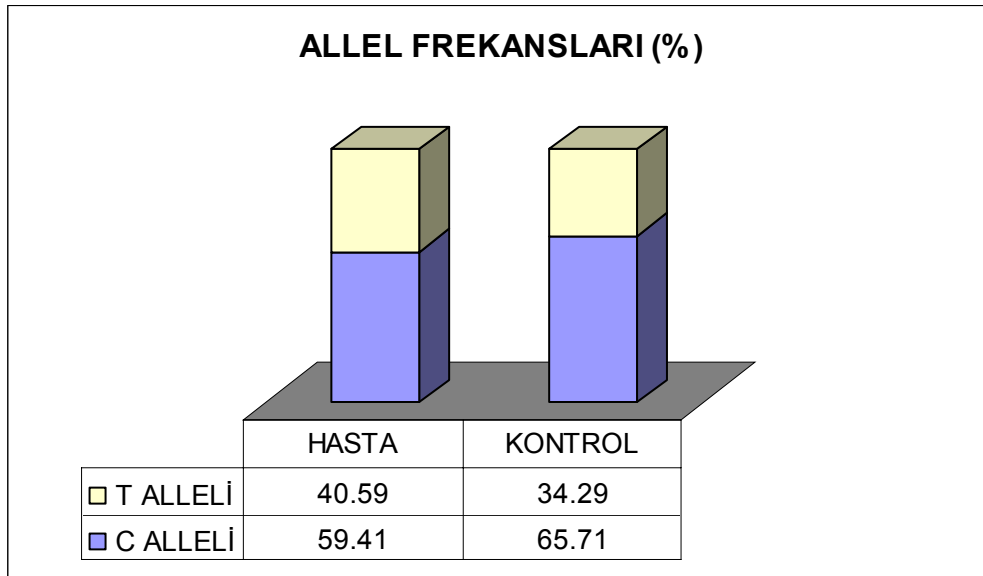
Çizelge 4.14: Hasta ve kontrol grubunun genotiplere göre vücut kitle indeksleri

	Genotip	Kontrol (n)	Kontrol Ortalama \pm SD	Hasta (n)	Hasta Ortalama \pm SD
BMI	CC	81	25,20 \pm 3,98	71	23,36 \pm 2,96
	CT	89	24,80 \pm 3,92	98	23,31 \pm 3,76
	TT	21	25,83 \pm 3,82	33	23,32 \pm 2,88
P değeri			0,525		0,995

Kontrol grubunda, genotipler arasında vücut kitle indeksleri bakımından istatistiksel olarak farklılık yoktur ($p= 0,525$). Benzer şekilde hasta grubunda da genotipler arasında vücut kitle indeksleri bakımından istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır ($p= 0,995$).

4.7. Kontrol ve hasta gruplarının allelik açıdan değerlendirilmesi

GNB3 C825T gen polimorfizmine ait hasta ve kontrol gruplarının C ve T allellere göre dağılımı ve Odds oranları şekil 4.4 ve çizelge 4.15’de verilmiştir.



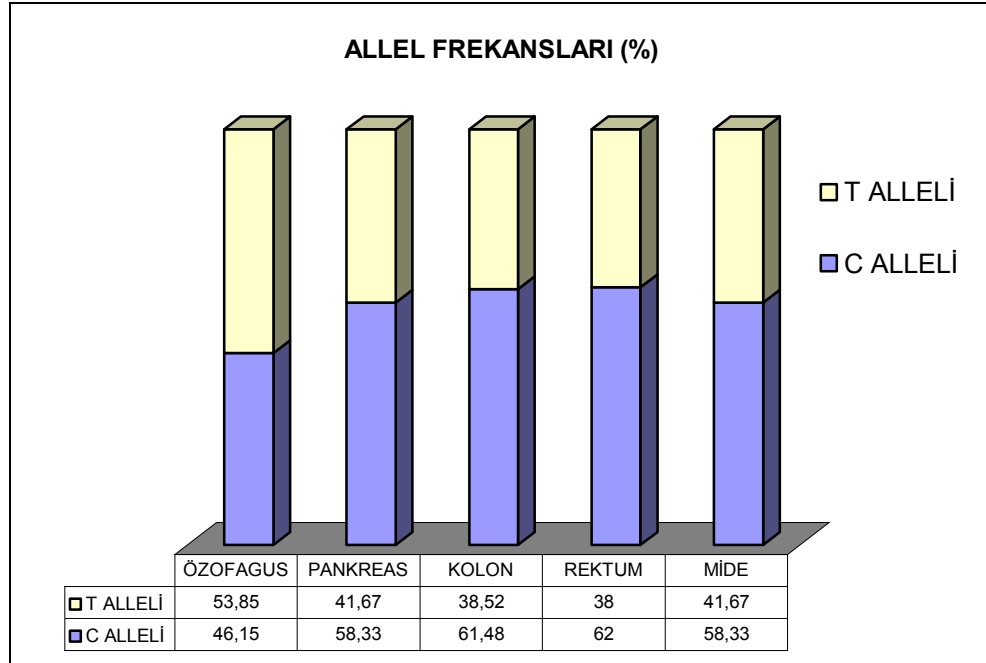
Şekil 4.4: GNB3 C825T Polimorfizmi allel frekansları.

Çizelge 4.15: GNB3 C825T Polimorfizmi allelik dağılımları ve odds oranları

GNB3 C825T Polimorfizmi	Kontrol	Gastrointestinal	P değeri	Odds Oranları (% 95 Güven Aralığı)
	Sayı (Yüzde)	Kanser Sayı (Yüzde)		
C Alleli	251 (%65,71)	240 (%59,41)		1 (referans)
T Alleli	131 (%34,29)	164 (%40,59)	0,068	1,309 (0,980 – 1,750)

Bu polimorfizm allelik açısından ki-kare analizi ile incelenmiş ve C alleli referans alınarak T allelinin hastalıkla ilişkisine ait risk oranları hesaplanmıştır. Buna göre T alleli, C alleli taşıyan bireylere göre gastrointestinal kanser açısından 1,309 kat risk taşımaktadır ($p=0,068$). İstatistiksel analiz sonucunda allel frekansında anlamlı bir değişimin olmadığına yani tüm allellerin hastalık riski açısından farklı olmadığına % 95 güvenle karar verilmiştir.

GNB3 C825T gen polimorfizmine ait hasta ve kontrol gruplarının hastalık yerlerine göre ayrı ayrı allelik dağılımları şekil 4.5’de grafik şeklinde verilmiştir.



Şekil 4.5: GNB3 C825T Polimorfizminin hastalık yerlerin göre ayrılmış allel frekansları.

Allel frekansları ve Odds oranları, hastalık yerlerine göre ayrı ayrı hesaplandığında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çizelge 4.16’da verilen sonuçlar elde edilmiştir. Hastalık yerleri mide, kolorektal, özofagus ve pankreas şeklinde kabul edilmiştir. Ki-kare analizi sonucunda mide, pankreas ve kolorektal kanserde hastalık yerlerinin farklılığına rağmen allel frekansında anlamlı bir değişimin olmadığına yani her iki allelin de hastalık riski açısından farklı olmadığına karar verilmiştir. Anlamlılık (p) değerleri çizelge 4.16’da belirtilmiştir.

Çizelge 4.16: Hastalık yerlerine göre GNB3 C825T Polimorfizmi allel dağılımları ve odds oranları

Hastalık Yeri	GNB3 C825T Polimorfizmi	Kontrol Sayı (Yüzde)	Hasta Sayı (Yüzde)	P değeri	Odds Oranları (% 95 Güven Aralığı)
Mide	C Alleli	251 (%65,71)	63 (%58,33)	0,158	1 (referans)
	T Alleli	131 (%34,29)	45 (%41,67)		1,369 (0,884 – 2,119)
Kolorektal	C Alleli	251 (%65,71)	137 (%61,7)	0,323	1 (referans)
	T Alleli	131 (%34,29)	85 (%38,3)		1,189 (0,843 – 1,676)
Özofagus	C Alleli	251 (%65,71)	12 (%46,15)	0,044	1 (referans)
	T Alleli	131 (%34,29)	14 (%53,85)		2,235 (1,005 – 4,972)
Pankreas	C Alleli	251 (%65,71)	28 (%58,33)	0,313	1 (referans)
	T Alleli	131 (%34,29)	20 (%41,67)		1,369 (0,743 – 2,523)

Özofagus kanserinde C allele göre, T allelinin hastalık riskini 2,235 kat artırdığı istatistiksel olarak izlenmiştir (p=0,044).

4.8.Hasta gruplarının evre, metastaz özelliklerine göre değerlendirilmesi

Hasta grubu tümör yayılımı, lenf nodu tutulumu ve uzak metastaz varlığı açısından TNM sınıflamasına göre evre 1'den 4'e kadar sınıflandırılmıştır. Evre 1 grubunda kanser hastalığı henüz tutulan organ içinde iken, evre 4'de uzak metastaz bulunur. Hasta grubu genotiplere ve evrelere göre ayrılıp, istatistiksel olarak incelendiğinde çizelge 4.17'deki veriler elde edilmiştir.

Çizelge 4.17: Gastrointestinal kanserli hastaların genotip ve hastalık evrelerine göre dağılımı

Genotipler (n=202)	Evre I Sayı(Yüzde)	Evre II Sayı(Yüzde)	Evre III Sayı(Yüzde)	Evre IV Sayı(Yüzde)	P Değeri
CC (n=71)	1 (%1,4)	25 (%35,2)	18 (%25,4)	27 (%38)	
CT (n=98)	5 (%5,1)	13 (%13,3)	32 (%32,7)	48 (%49)	p= 0,000
TT (n=33)	0 (%0)	1 (%3)	6 (%18,2)	26 (%78,8)	

Ki-kare analizi sonucunda gastrointestinal kanserli hastalarda genotipler ve hastalık evresi arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür (p= 0,000).

Hasta grubunun metastaz varlığı açısından değerlendirilmesi için hastalar metastaz var/yok şeklinde gruplandırılmıştır. Hasta grubu genotiplere ve metastaz varlığına göre istatistiksel olarak incelendiğinde çizelge 4.18'deki veriler elde edilmiştir.

Çizelge 4.18: Gastrointestinal kanserli hastaların genotip ve metastaz varlığına göre dağılımı

Genotipler n=202	Metastaz YOK Sayı (Yüzde)	Metastaz VAR Sayı (Yüzde)	P Değeri
CC (n=71)	44 (%62)	27 (%38)	
CT (n=98)	50 (%51)	48 (%49)	p= 0,001
TT (n=33)	7 (%21,2)	26 (%78,8)	

Ki-kare testi ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda gastrointestinal kanserli hastalarda genotipler ve uzak metastaz varlığı arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür (p= 0,001).

Hasta grubu CC ve CT+TT şeklinde genotiplere ve 1'den 4'e kadar evrelere ayrılıp, istatistiksel olarak tekrar incelendiğinde çizelge 4.19'daki veriler elde edilmiştir.

Çizelge 4.19: Gastrointestinal kanserli hastaların genotip ve hastalık evrelerine göre dağılımı

Genotipler (n=202)	Evre I Sayı(Yüzde)	Evre II Sayı(Yüzde)	Evre III Sayı(Yüzde)	Evre IV Sayı(Yüzde)	P Değeri
CC (n=71)	1 (%1,4)	25 (%35,2)	18 (%25,4)	27 (%38)	p= 0,000
CT+TT (n=131)	5 (%3,8)	14 (%10,7)	38 (%29)	74 (%56,5)	

Ki-kare analizi sonucunda gastrointestinal kanserli hastalarda genotipler CC ve CT+TT şeklinde gruplandırıldığında da genotip ve hastalık evresi arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür (p= 0,000).

Hasta grubu CC ve CT+TT şeklinde genotiplere ayrıldığında genotiplerle metastaz varlığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak tekrar incelendiğinde çizelge 4.20'deki veriler elde edilmiştir.

Çizelge 4.20: Gastrointestinal kanserli hastaların genotip ve metastaz varlığına göre dağılımı

Genotipler (n=202)	Metastaz YOK Sayı (Yüzde)	Metastaz VAR Sayı (Yüzde)	P Değeri
CC (n=71)	44 (%62)	27 (%38)	p= 0,012
CT+TT (n=131)	57 (%43,5)	74 (%56,5)	

Ki-kare analizi sonucunda gastrointestinal kanserli hastalarda genotipler CC ve CT+TT şeklinde gruplandırıldığında da genotip ve metastaz varlığı arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür (p= 0,012).

Hasta grubundaki C ve T allelleri ve hastalık evreleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde çizelge 4.21'deki veriler elde edilmiştir.

Çizelge 4.21: Gastrointestinal kanserli hastaların allel ve hastalık evrelerine göre dağılımı

Alleller	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	P Değeri
	Sayı(Yüzde)	Sayı(Yüzde)	Sayı(Yüzde)	Sayı(Yüzde)	
C Alleli (n=240)	7 (%2,9)	63 (%26,3)	68 (%28,3)	102(%42,5)	p= 0,000
T Alleli (n=164)	5 (%3)	15 (%9,1)	44 (%26,8)	100 (%61)	

n: Allel sayısı

Ki-kare analizi sonucunda gastrointestinal kanserli hastalarda C ve T allelleri ve hastalık evresi arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür (p= 0,000).

Hasta grubundaki C ve T allelleri ve metastaz varlığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde çizelge 4.22'deki veriler elde edilmiştir.

Çizelge 4.22: Gastrointestinal kanserli hastaların allellere ve metastaz varlığına göre dağılımı

Alleller	Metastaz YOK	Metastaz VAR	P Değeri
	Sayı (Yüzde)	Sayı (Yüzde)	
C Alleli (n=240)	138 (%57,5)	102 (%42,5)	p= 0,000
T Alleli (n=164)	64 (%39)	100 (%61)	

n: Allel sayısı

Ki-kare analizi sonucunda gastrointestinal kanserli hastalarda C ve T allelleri ve metastaz varlığı arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür (p= 0,000).

4.8. Hastalık yerlerine göre evre, metastaz özelliklerinin değerlendirilmesi

Hasta grubu genotiplere ve evrelere göre ayrılıp, hastalık yerlerine göre ayrı ayrı incelendiğinde çizelge 4.23'deki veriler elde edilmiştir.

Çizelge 4.23: Hastalık yerlerine göre kanserli hastaların genotiplere ve evrelere göre dağılımı

Hastalık Yeri	Genotipler	Evre I Sayı(Yüzde)	Evre II Sayı(Yüzde)	Evre III Sayı(Yüzde)	Evre IV Sayı(Yüzde)	P değeri
Mide (n=54)	CC	0 (%0)	4 (%20)	5 (%25)	11 (%55)	p= 0,441
	CT	1 (%4,3)	2 (%8,7)	7 (%30,4)	13 (%56,5)	
	TT	0 (%0)	0 (%0)	4 (%36,4)	7 (%63,6)	
Kolorektal (n=111)	CC	1 (%2,4)	18 (%42,9)	10 (%23,8)	13 (%31)	p= 0,002
	CT	4 (%7,5)	10 (%18,9)	19 (%35,8)	20 (%37,7)	
	TT	0 (%0)	1 (%6,3)	2 (%12,5)	13 (%81,3)	
Özofagus (n=13)	CC	0 (%0)	0 (%0)	1 (%50)	1 (%50)	p= 0,260
	CT	0 (%0)	0 (%0)	3 (%37,5)	5 (%62,5)	
	TT	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	3 (%100)	
Pankreas (n=24)	CC	0 (%0)	3 (%42,9)	2 (%28,6)	2 (%28,6)	p= 0,101
	CT	0 (%0)	1 (%7,1)	3 (%21,4)	10 (%71,4)	
	TT	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	3 (%100)	

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda mide (p=0,441), özofagus (p=0,260) ve pankreas kanserlerinde (p=0,101) genotipler ve hastalık evreleri arasında ilişki

saptanmamıştır. Kolorektal kanserlerde ise genotipler ve evreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p=0,002$).

Hasta grubu genotiplere ve metastaz varlığına göre ayrılıp, hastalık yerlerine göre ayrı ayrı incelendiğinde çizelge 4.24'deki veriler elde edilmiştir.

Çizelge 4.24: Hastalık yerlerine göre kanser hastalarının genotiplere ve metastaza göre dağılımı

Hastalık Yeri	Genotipler	Metastaz VAR	Metastaz YOK	P değeri
		Sayı(Yüzde)	Sayı(Yüzde)	
Mide (n=54)	CC	11 (%55)	9 (%45)	p= 0,892
	CT	13 (%56,5)	10 (%43,5)	
	TT	7 (%63,6)	4 (%36,4)	
Kolorektal (n=111)	CC	13 (%31)	29 (%69)	p= 0,002
	CT	20 (%37,7)	33 (%62,3)	
	TT	13 (%81,3)	3 (%18,8)	
Özofagus (n=13)	CC	1 (%50)	1 (%50)	p= 0,260
	CT	5 (%62,5)	3 (%37,5)	
	TT	3 (%100)	0 (%0)	
Pankreas (n=24)	CC	2 (%28,6)	5 (%71,4)	p= 0,036
	CT	10 (%71,4)	4 (%28,6)	
	TT	3 (%100)	0 (%0)	

Ki-kare istatistiksel analizi sonucunda kolorektal ($p=0,002$) ve pankreas kanserlerinde ($p=0,036$) genotipler ve metastaz varlığı arasında ilişki saptanmıştır. Mide kanserinde ($p=0,892$) ve özofagus ($p=0,260$) kanserinde ise genotipler ve metastaz varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

Hasta grubu allellere ve evrelere göre ayrıldığında ve hastalık yerlerine göre tekrar incelendiğinde çizelge 4.25'deki veriler elde edilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda mide (p=0,265), özofagus (p=0,264) ve pankreas kanserlerinde (p=0,064) alleller ve hastalık evreleri arasında ilişki saptanmamıştır. Kolorektal kanserlerde ise alleller ve evreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir (p=0,003).

Çizelge 4.25: Hastalık yerlerine göre kanserli hastaların allellere ve evrelere göre dağılımı

Hastalık Yeri	Alleller	Evre I Sayı(Yüzde)	Evre II Sayı(Yüzde)	Evre III Sayı(Yüzde)	Evre IV Sayı(Yüzde)	P değeri
Mide	C Alleli	1 (%1,6)	10 (%15,9)	17 (%27)	35 (%55,6)	p= 0,265
	T Alleli	1 (%2,2)	2 (%4,4)	15 (%33,3)	27 (%60)	
Kolorektal	C Alleli	6 (%4,4)	46 (%33,6)	39 (%28,5)	46 (%33,6)	p= 0,003
	T Alleli	4 (%4,2)	12 (%12,6)	33 (%34,7)	46 (%48,4)	
Özofagus	C Alleli	0 (%0)	0 (%0)	5 (%41,7)	7 (%58,3)	p= 0,264
	T Alleli	0 (%0)	0 (%0)	3 (%21,4)	11 (%78,6)	
Pankreas	C Alleli	0 (%0)	7 (%25)	7 (%25)	14 (%50)	p= 0,064
	T Alleli	0 (%0)	1 (%5)	3 (%15)	16 (%80)	

Hasta grubu allellere ve metastaz varlığına göre ayrılıp, hastalık yerlerine göre ayrı ayrı incelendiğinde çizelge 4.26'daki veriler elde edilmiştir.

Çizelge 4.26: Hastalık yerlerine göre kanser hastalarının allellere ve metastaza göre dağılımı

Hastalık Yeri	Alleller	Metastaz VAR	Metastaz YOK	P değeri
		Sayı(Yüzde)	Sayı(Yüzde)	
Mide	C Alleli	35 (%55,6)	28 (%44,4)	p= 0,645
	T Alleli	27 (%60)	18 (%40)	
Kolorektal	C Alleli	46 (%33,6)	91 (%66,4)	p= 0,003
	T Alleli	46 (%54,1)	39 (%45,9)	
Özofagus	C Alleli	7 (%58,3)	5 (%41,7)	p= 0,264
	T Alleli	11 (%78,6)	3 (%21,4)	
Pankreas	C Alleli	14 (%50)	14 (%50)	p= 0,034
	T Alleli	16 (%80)	4 (%20)	

Ki-kare istatistiksel analizi sonucunda kolorektal (p=0,003) ve pankreas kanserlerinde (p=0,034) alleller ve metastaz varlığı arasında ilişki saptanmıştır. Mide kanserinde (p=0,645) ve özofagus (p=0,264) kanserinde ise alleller ve metastaz varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir

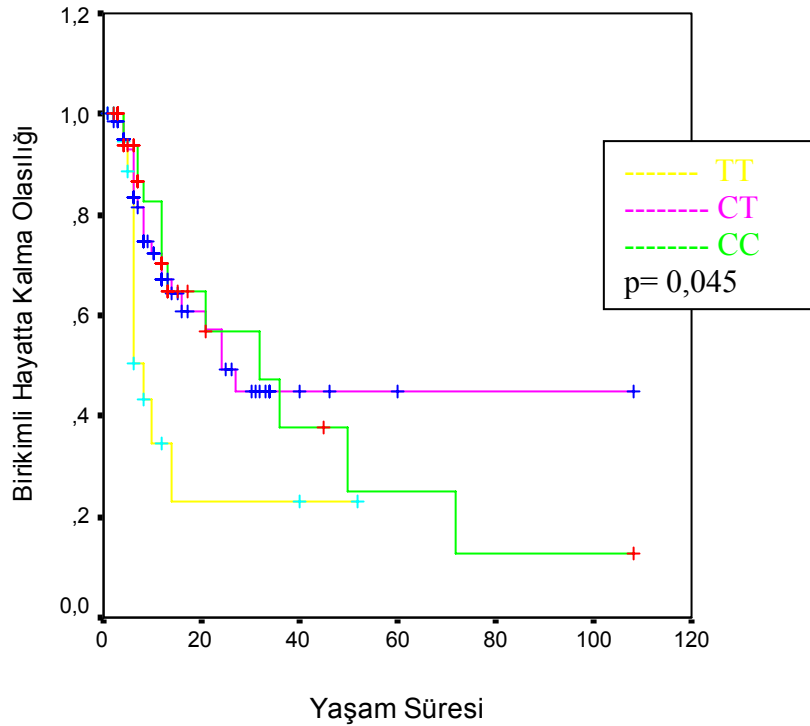
4.9. Hasta Grubuna Ait Yaşam Süresi Analizleri

Hasta grubundaki 202 hastanın %83,2'sine (n=168) cerrahi operasyon uygulanmıştır. %16,8'ine (n=34) ise kanser tedavisi için operasyon uygulanmamıştır. Hastaların tümü (n=202, %100) kemoterapi görmüştür. Hastaların %29,2'si (n=59) ise radyoterapi almıştır. Hastaların bir kısmının tedaviye yanıtları ve yaşam süreleri değerlendirilebilmiştir. Tedaviye yanıtları değerlendirilen 134 kişi, hastalık seyirlerine göre stabil, kısmi yanıt ve progresyon şeklinde sınıflandırılmıştır. Stabil hasta sayısı 57, kısmi yanıt veren hasta sayısı 20, ve progresyonlu hasta sayısı 57'dir. Yaşam süreleri açısından incelendiğinde ise hastaların 10'u çalışma sırasında ex olmuştur. Bir kısım hastanın yaşam süresi bakımından takibi yapılamamıştır. Yaşam süresi takip edilebilen

124 hastanın yaşam süresi ise ortalama ve standart sapması $14,48 \pm 17,67$ ay olarak saptanmıştır.

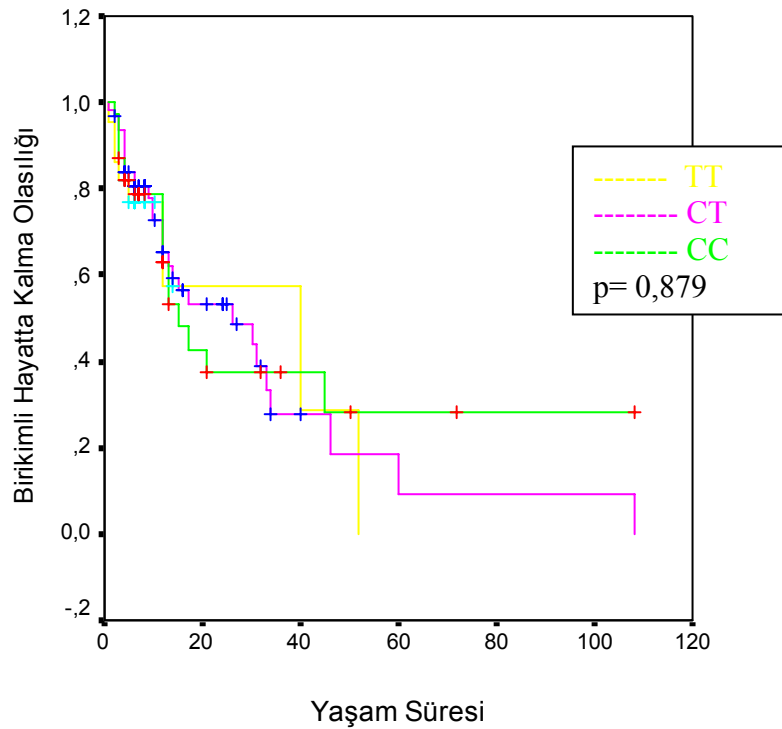
Hastalık seyirleri ve yaşam süreleri belirlenen 124 hastaya Kaplan-Meier sağkalım analizi uygulanmıştır. Hayatta kalma eğrilerinin karşılaştırılması amacıyla da Log rank testi kullanılmıştır.

Hastalık seyri bakımından progresyon gösteren hastaların genotipik ayrımlarına göre yaşam süresi analizleri yapıldığında sağkalımlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,045$). Şekil 4.6'da progresyonla seyreden hastalarda genotiplere göre ayrılmış hayatta kalma olasılıkları verilmiştir. İstatistiksel analize göre progresyon gösteren TT genotipli hastalarda ölümler ilk 14 ay içerisinde görülmüştür. TT genotipi taşıyan bir hastanın 14. ayın sonuna kadar yaşama olasılığı % 23,13 olarak saptanmıştır. Yine progresyonla seyreden CC genotipli kanser hastalarında ölümler 72 ay içerisinde gerçekleşirken, CT genotiplilerde ise sağkalım süresi 27 ay civarındadır. TT genotipli hastalarla karşılaştırıldığında, 14. ayda CC genotipli bir hastanın hayatta kalma olasılığı % 64,80'dir. CT genotipinde ise 14. ayda hayatta kalma olasılığı % 64,21 olarak saptanmıştır.



Şekil 4.6: Progresyonla seyreden hastalarda genotiplere göre ayrılmış hayatta kalma olasılıkları (Çizgilerdeki her kırılma o anda bir ölümün gerçekleştiğini göstermektedir.)

Hastalık seyri bakımından stabil seyreden hastaların genotipik ayrımlarına göre yaşam süresi analizleri yapıldığında ise sağkalımlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,879$). Şekil 4.7’de stabil seyreden hastalarda genotiplere göre ayrılmış hayatta kalma olasılıkları verilmiştir. İstatistiksel analize göre stabil seyirli TT genotipli hastalarda ölümler 52 ay içerisinde görülmüştür. Sağ kalım olasılıklarına örnek vermek gerekirse, TT genotipinde 12. ayın sonuna kadar yaşama olasılığı % 57,53 olarak saptanmıştır. CC genotipindeki hastalardaki son ölüm 45. ayda gözlenmişken, CT genotipi taşıyan gastrointestinal kanser hastalarında ise sağ kalım süresi 108 ay civarındadır. TT genotipli hastalarla karşılaştırıldığında, 12. ayda CC genotipli bir hastanın hayatta kalma olasılığı % 63,18 iken, CT genotipinde 12. ayda hayatta kalma olasılığı % 65,07 olarak saptanmıştır.

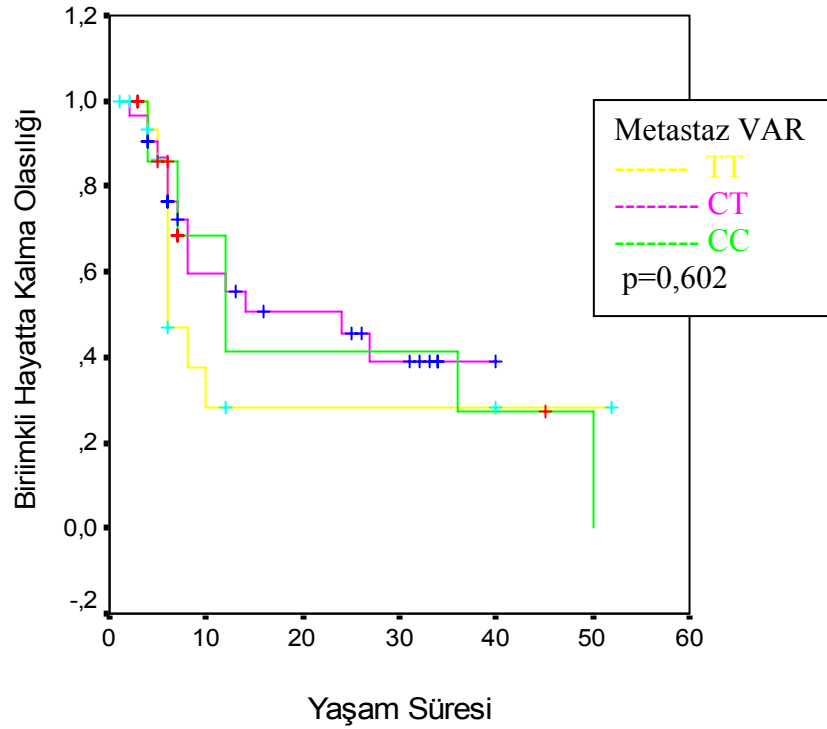


Şekil 4.7: Stabil seyreden hastalarda genotiplere göre ayrılmış hayatta kalma olasılıkları (Çizgilerdeki her kırılma o anda bir ölümün gerçekleştiğini göstermektedir.)

Hastalığı stabil seyreden bireyler, progresyon gösterenlerle karşılaştırıldığında progresyonlu hastalarda TT genotipi taşıyan bireylerin yaşam süresinin kısaldığı

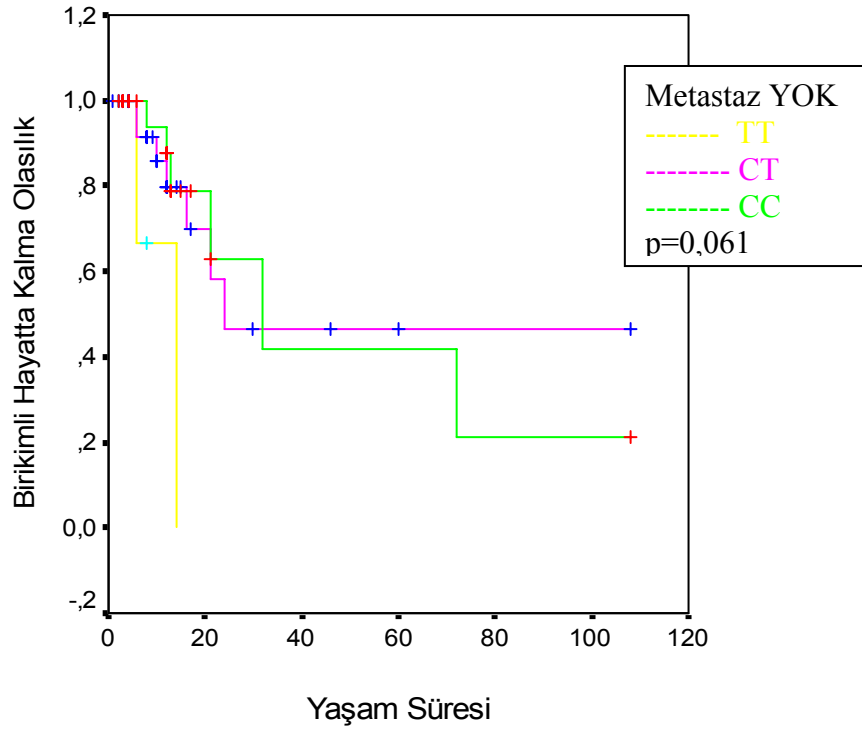
gözlenmiştir. Stabil seyir gösterenlerde ise genotip ve yaşam süresi bakımından fark bulunmamıştır.

Progresyonla seyreden hastalar genotipler dışında metastaz varlığı açısından da değerlendirildiğinde ve sağkalım analizleri yapıldığında metastazı olan hastalarda genotipler arasında yaşam süreleri açısından fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0,602$). CC genotipine sahip ve metastazı olan hastalarda ölümler 50 ay içerisinde gerçekleşirken, CT genotipinde bu süre 27 ay civarındadır. TT genotipine sahip, metastazı olan ve hastalığı progresyon gösteren bireylerde ise ölümler 10 ay içerisinde gerçekleşmektedir. TT genotipli hastaların 10. ayda hayatta kalma olasılığı % 28,20 iken, aynı ay için bu oran CC genotiplilerde % 68,57, CT genotipli bireylerde ise % 59,63 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Progresyonla seyreden ve metastazı olan hastalarda genotiplere göre ayrılmış hayatta kalma olasılıkları (Çizgilerdeki her kırılma o anda bir ölümün gerçekleştiğini göstermektedir.)

Metastazı olmayan fakat hastalığı progresyon gösteren bireyler de genotipler açısından değerlendirildiğinde ve sağkalım analizleri yapıldığında metastazı olmayan hastalarda genotipler arasında yaşam süreleri açısından fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0,061$). CC genotipine sahip ve metastazı olmayan hastalarda ölümler 72 ay içerisinde gerçekleşirken, CT genotipinde bu süre 24 ay civarındadır. TT genotipine sahip, metastazı olan ve hastalığı progresyon gösteren bireylerde ise ölümler 14 ay içerisinde gerçekleşmektedir. TT genotipli hastaların örneğin, 8. ayda hayatta kalma olasılığı % 66,67 iken, aynı ay için bu oran CC genotiplilerde % 93,75, CT genotipli bireylerde ise % 91,30 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.9).

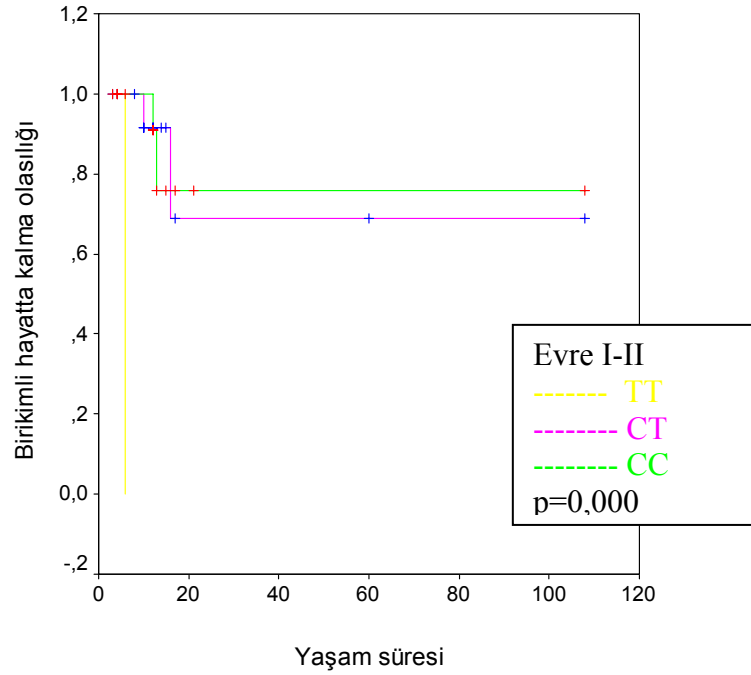


Şekil 4.9: Progresyonla seyreden ve metastazı olmayan hastalarda genotiplere göre ayrılmış hayatta kalma olasılıkları. (Çizgilerdeki her kırılma o anda bir ölümün gerçekleştiğini göstermektedir.)

Stabil ilerleyen hastalar da metastaz varlığı ve genotipler açısından değerlendirilip, sağkalım analizleri yapıldığında metastazı olmayan stabil hastalarda genotipler arasında yaşam süreleri açısından fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0,771$). Aynı

şekilde uzak metastazı olan fakat daha yavaş seyirli, stabil hastalarda da genotipler arasında yaşam süreleri açısından fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0,436$). Örneğin metastazı olmayan TT genotipine sahip hastalarda 10. ayda hayatta kalma olasılığı % 75 iken, aynı ay için bu oran yine TT genotipli ve metastazı olan bir hastada % 76,92 olarak tespit edilmiştir.

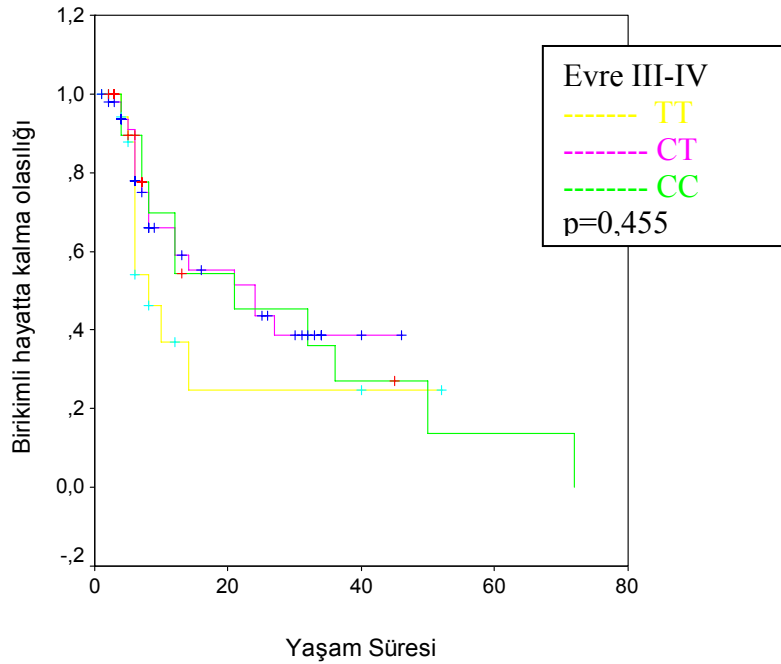
Hastalığı hızlı yani progresyonla seyreden gastrointestinal kanserli hastalar evre I-II ve evre III-IV şeklinde ayrılıp, genotiplere göre sağkalım olasılıkları incelendiğinde de şu sonuçlar elde edilmiştir. Evre I-II'de yer alan fakat hastalığı hızla seyreden hastalarda genotipler arasında fark bulunmuştur ($p=0,000$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Progresyonla seyreden evre I-II hastaların genotiplere göre ayrılmış hayatta kalma olasılıkları (Çizgilerdeki her kırılma o anda bir ölümün gerçekleştiğini göstermektedir.)

Evre I-II'de yer alan hastalarda progresyon gösterenlerin sağkalım olasılıkları incelendiğinde CC genotipindeki bir hastanın 12. aya kadar yaşama olasılığı % 90,91 iken, bu oran CT genotipinde % 91,67'dir. Evre I-II içerisinde TT genotipi taşıyan sadece bir hasta yer almaktadır ve onun da yaşama olasılığı 6 ay olarak değerlendirilmiştir.

Evre III-IV’de yer alan ve hastalığı progresyon şeklinde seyreden hastalarda Kaplan-Meier sağkalım analizi yapılmış ise genotipler arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunmamıştır ($p=0,455$). CC genotipli hastalarda ölümler 72 ay içerisinde gerçekleşirken, CT genotipinde 27 aya, TT genotipinde ise 14 aya kadar görülmektedir. Evre I-II ile karşılaştırmak açısından, 12. aya kadar yaşama olasılığı CC genotipinde % 54,28, CT genotipinde % 59,03 ve TT genotipinde ise % 37,07 olarak izlenmektedir.(Şekil 4.11). Şekil 4.10 ve şekil 4.11 incelendiğinde, evrenin yükselmesi ile tüm genotiplerde aynı aylar için yaşama olasılıklarının azalmakta olduğu görülmektedir.



Şekil 4.11: Progresyonla seyreden evre III-IV hastaların genotiplere göre ayrılmış hayatta kalma olasılıkları (Çizgilerdeki her kırılma o anda bir ölümün gerçekleştiğini göstermektedir.)

Progresyonla seyreden ve metastazı olan ve olmayan gastrointestinal kanserli hasta grupları, hastalık yerleri ve genotipik dağılımlarından bağımsız olarak incelenmiştir. Metastaz olması ve olmaması durumunda yaşam sürelerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olduğu izlenmiştir ($p=0,006$). Progresyonla seyreden hastaların metastazları var ise yaşam süreleri 72 aydan 50 aya kadar inmektedir.

Aynı durum stabil olarak seyreden hasta grubu için de geçerlidir. Metastaz olması durumunda yaşam sürelerinin metastazı olmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde kısa olduğu izlenmiştir (p=0,012). Stabil seyirli hasta grubunda metastaz varlığı sağkalım olasılığını 108 aydan 52 aya kadar indirmektedir. Yine bu sonuçlar bize kanserin stabil seyretmesi durumunda yaşamın daha uzun olduğunu gösterebilmektedir. Kanserli hastalarda metastaz varlığı evreyi artırmaktadır ve kötü prognozla ilişkilidir. Hem progresyonla, hem de stabil seyreden hastalarda izlemiş olduğumuz bu sonuçlar kanser ve metastaz açısından bildiklerimizi doğrulamakta olan sonuçlardır ve çalışma grubumuzun doğruluğunu test etmek açısından değerlidir.

4.10.Hasta ve kontrol gruplarının tümör belirteçleri ve lenfosit değerleri bakımından değerlendirilmesi

Hasta ve kontrol grubumuz, GNB3 gen polimorfizminin immünite ile olan ilişkisine değinebilmek için lenfosit düzeyleri açısından kabaca değerlendirilmiştir. Yine gastrointestinal kanserli hastalarda özellikle tedavi takip ve değerlendirmesinde kullanılan bazı tümör belirteçleri (Karsinoembriyonik antijen ve CA 19-9) çalışılmıştır. Çizelge 4.27’de elde edilen sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 4.27: Hasta ve kontrol gruplarının lenfosit değerleri ve tümör belirteçleri açısından değerlendirilmesi

		Ortalama ± SD	Yüzdeler	
			Medyan (%50)	%25-75
Lenfosit (x10³/µl)	Hasta	1,66 ± 1,02	1,52	1,01-2,14
	Kontrol	2,21 ± 0,69	2,20	1,64-2,64
CEA (ng/ml)	Hasta	53,12 ± 175,93	3,30	1,57-9,65
	Kontrol	2,54 ± 6,82	1,39	1,05-2,31
CA 19-9 (U/ml)	Hasta	237,15 ± 724,86	22,4	8,07-103,68
	Kontrol	12,83 ± 10,90	9,50	4,41-18,9

SD: Standart sapma

Mann Whitney U testi sonucunda lenfosit ($p=0,000$), CA 19-9 ($p=0,000$) ve CEA ($p=0,000$) değerleri bakımından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.

Hasta ve kontrol grupları daha sonra lenfosit değerleri bakımından genotiplere ayrılarak karşılaştırılmıştır. Hem kontrol ($p=0,361$), hem de hasta grubunda ($p=0,699$) lenfosit değerleri bakımından genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur.

5. TARTIŞMA

Kanser günümüzde ölümcül ve düşkünlük yaratan önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Gastrointestinal sistem kanserlerinin oluşumunda rol alan etiyolojik ve patojenik mekanizmalar oldukça karmaşıktır. Bu etiyolojik etmenlerden son yıllarda üzerinde en çok çalışılanı moleküler mekanizmalardır. Kanserle ilişkili olduğu bildirilen genler çoğunlukla hücre büyüme ve farklılaşmasının kontrolünde, DNA onarımında ve genomik bütünlüğün sağlanmasında görev alan genlerdir (21).

Hücre içi sinyal iletimi metabolik yolların işletilmesi ve düzenlenmesinde yer alan temel düzenektir. Moleküler düzeydeki tepkimeler ve gen ifadelerinin düzenlenmeleri de sinyal iletimiyle ilişkilidir. Hücre içi sinyal iletiminde görev alan pek çok ikincil mesajcı ve protein arasında G proteinleri önemli bir yere sahiptir. G protein sinyalizasyonundaki anormallikler pek çok bozukluğa neden olmaktadır. G protein alt birimlerini kodlayan gene ait işlevsel olarak önemli genetik polimorfizmler, çeşitli hastalıklara neden olabilmekte veya hastalıkları tetikleyebilmektedir (109). G-proteinlerinin $\beta 3$ alt birimini kodlayan GNB3 genindeki polimorfizmler belirgin hücresel ve metabolik etkilerle ilişkilidir. Hücre büyümesi ve mitozdaki rolleri nedeniyle heterotrimerik G proteinlerinin tümör gelişimi ve büyümesi ile ilişkili olduğu düşünülebilir (3). Son yıllarda GNB3 gen polimorfizmi ve kanser ilişkisini araştıran çalışmalar giderek artmaktadır (3, 18, 110, 111, 112).

Gastrointestinal sistem kanserleri ile sinyal yollarında çok önemli rolleri olan heterotrimerik G proteinleriyle bağlantılı GNB3 geni C825T polimorfizmi arasındaki olası ilişkiyi araştırdığımız çalışmamızda ilk önce hasta ve kontrol gruplarının yaş, cinsiyet, vücut kitle endeksi, aile öyküsü, sigara ve alkol kullanımı özellikleri sorgulandı. Gastrointestinal kanserlerin insidansının yaş ile artış göstermesi ve hastaların yaşlarının ortalama 21–85 arasında olması nedeniyle kontrol grubu oluşturulurken bireylerin özellikle benzer yaş grubu aralığında olmasına dikkat edilmiştir. Kontrol grubu yaşları 19 ile 76 arasında değişen 191 kişiden oluşmaktadır. Yaş aralığı benzer olmakla birlikte çalışmamızda hasta ve kontrol grubunda yaş ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır. Hasta grubu yaş ortalaması 58,25 iken kontrol grubunda 49,85 olarak bulunmuştur. Bunun sebebi kontrol grubuna kanser, diyabet, hipertansiyon, romatizmal hastalıklar gibi kronik

hastalığı olmayan, ailesinde kanser öyküsü bulunmayan, tamamen sağlıklı olduğu düşünülen bireylerin dahil edilmesidir. Kronik hastalıklar sıklıkla ileri yaşlarda görülmektedir, kronik hastalığı olan bireyler çalışma dışı bırakıldığından dolayı kontrol grubunda yaş ortalaması daha düşük izlenmiştir. Fakat her iki grup da orta yaş grubu olarak kabul edilen 45 ile 64 yaş arasında yer almaktadır (108). Bu farklılık bize gastrointestinal kanserlerin orta yaş ve üzerinde ortaya çıktığını göstermektedir. Hastalık yerleri ayrı ayrı ele alındığında ise özofagus kanserinin 53,54 yaş ile daha erken yaşlarda ortaya çıktığı izlenmektedir. Ortalama yaş kolon kanserinde 57,73 iken, mide kanserinde 55,37'dir. Pankreas kanseri (ortalama yaş 61,21) ve rektum kanseri ise (ortalama yaş 61,78) daha ileri yaşta görülmüştür.

Vücut kitle endeksleri bakımından hasta ve kontrol grubu arasında fark olduğu bulunmuştur. Kontrol grubunda vücut kitle indeksi gastrointestinal hastalara göre daha yüksek olarak izlenmiştir. Bunun sebebi kanser hastalarında hastalık seyri ve tedaviye bağlı olarak izlenen ve beslenme bozukluğundan etkilenen kilo kaybından kaynaklanmaktadır. Hastalık yerleri ayrı ayrı incelendiğinde de tüm kanserlerde vücut kitle indeksi kontrol grubundan düşük bulunmuştur. Kilo kaybı ile ilgili olduğunu düşündüğümüz bu azalma en fazla özofagus kanserinde izlenirken, fark en az rektum kanserinde görülmüştür.

Aile öyküsü, sigara ve alkol kullanımı gibi kanser etiolojisinde rol alan risk faktörleri açısından hasta ve kontrol grubu arasında fark bulunmamıştır. Tedavi takibinde yararlanılan tümör belirteç (CA 19-9 ve CEA) düzeylerinin ise hasta grubunda kontrollere göre arttığı izlenmiştir.

GNB3 geni C825 T gen polimorfizmi ile gastrointestinal kanser ilişkisini incelemeye başlarken ise ilk olarak hasta ve sağlıklı kontrol grubunun genotip dağılımının Hardy-Weinberg dengesine uyumluluğu test edilmiştir ve her iki grubun da dengede olduğu saptanmıştır.

Genotip frekansları gastrointestinal kanserli hasta grubunda incelemesinde, CC genotipi referans olarak alındığında ve CT ve TT genotipleri ile karşılaştırıldığında, hasta ve kontrol gruplarında genotip frekansında anlamlı bir değişimin olmadığı yani tüm genotiplerin kanser riski açısından farklı olmadığı görülmüştür. Çalışmamızda heterozigot veya homozigot T alleli taşıyıcılarındaki yani CT+TT genotiplerini taşıyan bireylerdeki hastalık ilişkisi ve risk oranları incelendiğinde bu genotiplerin

gastrointestinal kanser riski taşımak açısından CC genotipinden farklı olmadığına karar verilmiştir.

Cinsiyet açısından genotip dağılımına bakıldığında kontrol grubunda genotipler ve cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki izlenmezken, gastrointestinal kanserli hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p= 0,042$). Bu sonuca göre gastrointestinal kanserleri olan erkeklerde CT ve TT genotipleri daha sık görülmektedir. Gordon MA ve arkadaşları (113), kolorektal kanserli hastalarda 12 gene ait 24 polimorfizmin çalışılıp, kadın ve erkek hastaların ayrı ayrı incelendiği araştırmalarında, hastalığın ortaya çıkışı, tümör yanıtı ve yaşam süresiyle ilgili olarak her iki cinsten farklı genlerin rol aldığı tespit edildiğini bildirmektedir. Araştırmacılar cinsiyetin kolorektal kanser gelişiminde ve progresyonunda önemli rol oynadığını belirtmektedirler (113).

Çalışmamızda kontrol grubunun T allel frekansı % 34,29 olarak izlenmiştir. 1999 yılında Siffert W. ve arkadaşlarınınca yapılan ve tüm dünya ülkelerinden örneklerin alındığı, ırklara göre gruplandırıldığı bir çalışmada beyaz ırkta T allel frekansı % 33 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada Türkiye'den de 138 kişi yer almaktadır ve muhtemelen yurt dışında yaşayan vatandaşlarımızın katıldığı çalışma sonucuna göre T allel sıklığı Türkiye için % 38 olarak bildirilmiştir (16). Türkiye ile ilgili olarak yayınlanmış başka bir veri bulunmamaktadır. Aynı çalışmada siyah Afrikalılarda T allel sıklığı % 79, Mongoloidlerde (Çin, Japonya, Kore, Tayland) % 46, Amerika yerlilerinde % 26 ve Avustralya yerlilerinde ise % 72 olarak verilmektedir (16). Kanada Oji-Cree yerlilerinde T allel frekansı % 50,1 olarak bildirilmiştir. Bu oran beyaz ırka göre oldukça fazladır (11). 2002 yılında Rosskopf D ve arkadaşlarının yaptığı etnik dağılımların belirtildiği çalışmada GNB3 gen polimorfizmi için T allel sıklığı beyaz ırkta % 30,1, Afrikalılarda % 82,3 ve Çinlilerde ise % 42,3 olarak bildirilmektedir (91). Yapılan etnik dağılım araştırmalarına göre, konumu nedeniyle Türkiye'deki 825T allel sıklığının Avrupa ve Asya arasında yer aldığı söylenebilmektedir.

Gastrointestinal sistem kanserli hasta grubundaki bireylerin hastalık yerlerine göre dağılımı 13 özofagus kanseri, 54 mide kanseri, 61 kolon kanseri, 50 rektum kanseri ve 24 pankreas kanseri şeklindedir. Gastrointestinal kanserli hastalar hastalık yerlerine göre ayrı ayrı incelendiğinde mide kanserli hastalarla kontrol grubu arasında genotip ve allel dağılımları açısından fark bulunmamıştır. T allel frekansı mide kanserinde % 41,7

olarak gözlenmiştir. Kolorektal kanserli hastalarla kontrol grubu arasında genotip ve allel dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. T allel frekansı kolorektal kanserli hastalarda % 38,3 olarak bulunmuştur. Özofagus kanserli hastalar genotipik dağılım açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık görülmezken, allel frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmiştir ($p=0,044$). T allel frekansı özofagus kanserli hastalarda % 53,9 olarak gözlenmiştir. T alleli taşıyan bireylerde özofagus kanseri riski C allel taşıyıcılarına göre 2,235 kat fazla olarak saptanmıştır ($OR=2,235$, $\%CI=1,005-4,972$). Pankreas kanserinde hasta ve kontrol grubu arasında genotip ve allel frekansları bakımından fark izlenmemiştir. T allel frekansı pankreas kanserli hastalarda % 41,7 olarak gözlenmiştir. Pankreas kanserli hasta grubunda alkol kullanımı açısından kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür ($p=0,009$).

Meme kanserli hastalarda genotip ve allel frekansları açısından anlamlı fark bulunmadığı bildirilmektedir. T allel sıklığı hastalarda %30,4, kontrol grubunda ise %28,7 olarak, TT genotip sıklığı ise hastalarda %10,5, kontrollerde ise %7,5 ve T allel için Odds oranı 1,02 olarak saptanmıştır (3). Mesane kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada ise T allel frekansı %34,7 olarak bulunmuştur (110).

Kolorektal kanserlerle ilgili yapılan bir çalışmada ise C allelinin T allele göre 1,93 kat daha fazla riske sahip olduğu bildirilmiştir. Kolorektal kanserli 157 hasta ve 373 kontrolle yapılan çalışmada T allel frekansları hastalarda %20,2, kontrollerde ise %33,5 olarak izlenmiştir. C alleli ise hastalarda %79,8, kontrollerde ise %66,5 sıklıktadır. Çalışma grupları arasında hem genotipik, hem de allelik açıdan fark bulunmuştur (18).

Kolorektal kanser etiyolojisi çok etkenli olup, çevresel faktörlerin yanı sıra poligenik alt yapı da önemlidir. Kolon duvarındaki enflamatuvar değişiklikler de kanser gelişiminde önemlidir. GNB3 T alleli de artmış hücre yanıtı ve enflamatuvar olaylarla ilişkilidir (18). Bu yönden bakıldığında 825T allelinin kolorektal kanser açısından bir risk faktörü olduğu varsayılabilir. Böylesine bir ilişki, bizim çalışmamızda saptanmamıştır. Öfner D. ve arkadaşları ise 825C alleli ile kolorektal kanser arasında bir ilişki gözlemlemişlerdir (18). Kolorektal kanser çalışmasına ait sonuçlar, bizim bulduğumuz sonuçlar ile farklılık göstermektedir. Çalışma sonuçlarımız, frekanslarda değişiklik olmasına rağmen, Krippel P. ve arkadaşları (3) tarafından bildirilenlerle

örtüşmektedir. Meme kanseri ve kolorektal kanser çalışmalarındaki farklılıklar her iki kanserin de farklı etiyojilere sahip, farklı moleküler alt yapıya sahip kanserler olmaları ile açıklanabilmektedir (3). Genetik çalışmalarda örneklem büyüklüğü oldukça önem taşımaktadır. Bizim çalışmamızda 61 kolon kanserli, 50 rektum kanserli hasta yer almaktadır. Kontrol grubumuz 191 kişiden oluşmaktadır. Özellikle çalışılan kontrol gruplarının sayısında önemli bir farklılık gözlenmektedir. Kolorektal kanser çalışmasında sadece sonuçlar yer almakta olup, bildiride tartışma yapılmamıştır. C alleli ve kolorektal kanser ilişkisini immünite üzerinden düşündüğümüzde, T allel taşıyıcılarında immün yanıtın arttığını görmekteyiz (14,17). Bu nedenle C allel taşıyıcılarında immünitinin T alleleline göre daha zayıf olduğu söylenebilir. İnsan kanserlerinde hücrel immün yetmezlik görüldüğü bildirilmiştir (2). Kansere ilgili araştırmalarda enflamatuvar hastalıklar ile solid tümör oluşumu arasındaki ilişkilerden de bahsedilmektedir (114). Her ne kadar GNB3 geni enflamatuvar yanıtla ilgili ise de kanser gelişiminde immünite ve diğer faktörler de önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda kanser hastalarında immüniteyi kabaca değerlendirdiğimizde lenfosit düzeylerinin kontrollere oranla anlamlı olarak azaldığı dikkati çekmektedir. Fakat bu düşük değerlerin GNB3 C825T polimorfizmiyle ilişkisi bulunmamıştır.

Hasta grubu tümör invazyonu, lenf nodu tutulumu ve metastatik özellikleri açısından evrelere ayrılmıştır. Evre I'de prognoz iyi iken, evre IV'e doğru kötüleşmektedir. Hasta grubunun genotipik dağılımı evrelere göre ayrıldığında, gastrointestinal kanserli hastalarda genotipler ve hastalık evresi arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür ($p= 0,000$). CT ve TT genotipine sahip bireylerin dağılımı evre ilerledikçe artmaktadır. TT genotipinde evre I içinde yer alan hasta mevcut değildir. Metastaz varlığı açısından değerlendirildiğinde ise gastrointestinal kanserli hastalarda genotipler ve uzak metastaz varlığı arasında da anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür ($p= 0,001$).

Hasta grubu bir veya iki adet T allel taşıyan CT+TT genotipleri şeklinde ele alındığında da genotip ve hastalık evresi arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür ($p= 0,000$). Gastrointestinal kanserli hastalarda C ve T allelleri ve hastalık evresi arasında da anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür ($p= 0,000$). Yine T allel sıklığı evre IV'e doğru artmaktadır. Aynı şekilde C ve T allelleri ve metastaz varlığı arasında da

anlamli bir iliŒki olduğu grlmŒtir (p= 0,000). T allel taŒıyan gastrointestinal kanser hastalarında metastaz daha sık izlenmektedir.

Bu analizler hastalık yerlerine göre ayrı ayrı yapıldığında ise mide, özofagus ve pankreas kanserlerinde genotipler ve hastalık evreleri arasında iliŒki saptanmamıŒ olup, kolorektal kanserlerde ise genotipler ve evreler arasında istatistiksel olarak anlamli bir iliŒki saptanmıŒtır (p=0,002). TT genotipindeki kolorektal kanserli hastaların %81,3' evre IV içerisinde yer almaktadır. İstatistiksel olarak anlamli olmamakla birlikte diğer kanserlerde de CT ve TT genotipi taŒıyan hastaların evrelere göre dağılımlarının evre I'den IV'e doğru giderek arttığı gözlenmektedir. İstatistiksel anlam taŒımayan bu sonuç hasta grubunu oluŒturan örneklem sayısının yetersiz olması ile açıklanabilir.

Kolorektal ve pankreas kanserlerinde genotipler ve metastaz varlığı arasında iliŒki (sırasıyla p=0,002 ve p=0,036) saptanmıŒtır. Mide kanserinde ve özofagus kanserinde ise genotipler ve metastaz varlığı arasında istatistiksel olarak anlamli bir iliŒki tespit edilmemiŒtir. TT genotipi taŒıyan pankreas kanserli hastaların tamamında ve kolorektal kanserli hastaların ise % 81,3'nde uzak metastaz gzlenmiŒtir.

Mide, zofagus ve pankreas kanserlerinde alleller ve hastalık evreleri arasında iliŒki saptanmamıŒtır. Kolorektal kanserlerde ise alleller ve evreler arasında istatistiksel olarak anlamli bir iliŒki saptanmıŒtır (p=0,003). Kolorektal kanserde T allel taŒıyan hastalar genellikle ileri evrelerde yer almaktadırlar. T allel taŒıyan hastaların % 34,72'si evre III, % 48,4' ise evre IV hastalardır. Metastaz varlığı açısından ise kolorektal (p=0,002) ve pankreas kanserlerinde (p=0,034) alleller ve metastaz varlığı arasında iliŒki saptanmıŒtır. Mide kanserinde ve özofagus kanserinde ise alleller ve metastaz varlığı arasında anlamli bir iliŒki tespit edilmemiŒtir. T alleli taŒıyan pankreas ve kolorektal kanserli hastalarda metastaz görülme olasılığı C alleleline göre daha yüksektir.

Kanserli hastalarda tedaviye yanıtın değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle tümörün bazal büyüklük ölçüsü tedavi takibinde kullanılmaktadır. Solid tümörlerde yapılan tedavi yanıt ölçütlerinin belirlenmesini amaçlayan bir alıŒmaya göre (RECIST= responce evaluation criteria in solid tumors) eğer tedavi sonrasında tüm hedef organlardaki lezyon kaybolmuŒ ise bu tam yanıttır. Lezyonda en az % 30 oranında azalma kısmi yanıt, lezyonda en az % 20 kadar bir büyüme ise progresyon olarak kabul edilmektedir. Stabil hastalarda ise, tümör boyutunda kısmi yanıtta gibi bir azalma izlenmezken, progresyondaki kadar bir büyüme de mevcut değildir.

Hedef organlardaki yanıtın dışında, tam yanıt olduğunda tümör belirteçleri normal düzeylere dönerken, kısmi yanıt/stabil hastalarda bu düzeylerdeki yükseklik devam etmektedir (115). Dünya sağlık örgütü (WHO) ölçütlerine göre ise progresyon gösteren hastalarda tümör boyutunda % 25 artış olmaktadır. RECIST çalışma grubu ise bu değerlendirmede tümör boyutunu değil tümör çapını kullanmakta ve çapta % 20'lik bir artışı progresyon ölçütü olarak almaktadırlar (115). Tümör boyutlarındaki büyümenin yanı sıra hedef organ ve dışında yeni lezyon görülmesi de (metastaz) progresyon ölçütü olarak kabul edilmektedir. Fakat kanserli hastalarda sadece tedavi yanıtının değerlendirilmesi yeterli olmamakta, yaşam süresi takiplerinin de yapılması gerekmektedir (115).

Çalışmamızda gastrointestinal kanserli hastaların (n=202) bir kısmının tedaviye yanıtları ve yaşam süreleri değerlendirilebilmiştir. Tedaviye yanıtları değerlendirilen 134 hasta, hastalık seyirlerine göre stabil (n=57), kısmi yanıt (n=21) ve progresyon (n=66) şeklinde sınıflandırılmıştır. Progresyon izlenen 9, kısmi yanıt izlenen 1 hasta ölmüştür. Yaşam süresi takip edilen 124 hastanın ortalama yaşam süresi $14,48 \pm 17,67$ ay olarak saptanmıştır. Çalışmamızda hasta takip süremiz kısa olduğu için tedavi yanıt sınıflandırması içinde tam remisyona yer almamaktadır. Remisyon kanserin tedaviye verdiği yanıtıdır ve asla kür anlamına gelmemektedir. Tam remisyon denilebilmesi için tedavi sonrası kanserin tamamen yok olması gereklidir. Eğer uygulanan tedaviler sonrasında klinik, radyolojik, patolojik ve sitogenetik olarak kanser belirtisi yoksa tam remisyondan söz edilebilmektedir. Fakat burada önemli olan süredir ve bu süre genellikle teşhisten sonraki beş yıl olarak kabul edilmektedir (116). Kolorektal kanserli hastaların % 20–40 kadarında ilk iki yıl içerisinde rekürrens izlenmektedir. Hastaların takip edilmesi özellikle ilk iki yıl oldukça önem taşımaktadır. Hastaların ilk üç yıl 4 ayda bir, daha sonraki iki yıl ise 6 ayda bir izlenmesi önerilmektedir (52).

Hastalık seyri bakımından progresyon gösteren hastaların genotipik ayrımlarına göre yaşam süresi analizleri yapıldığında sağ kalımlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,045$). TT genotipindeki gastrointestinal kanserli hastalarda hastalığa bağlı ölümler diğer genotiplere göre daha erken başlamaktadır. Benzer şekilde aylara bölünerek yapılan inceleme sonucunda TT genotipinde sağ kalım olasılıkları da CC ve CT genotipine göre daha düşük olarak saptanmıştır. Progresyon gösteren yani hastalığı hızlı ilerleyen hastaların aksine, stabil seyreden hastalarda

genotipler ve sağ kalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Progresyonla seyreden hastalar metastaz varlığı açısından incelendiğinde, metastazı olan hastalarda genotipler arasında yaşam süreleri açısından fark olmadığı gözlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber, TT genotipine sahip, metastazı olan ve hastalığı progresyon gösteren bireylerde ölümler 10 ay içerisinde gerçekteşmektedir. Örneğin TT genotipli hastaların 10. ayda hayatta kalma olasılığı % 28,20 iken, aynı ay için bu oran CC genotiplilerde % 68,57, CT genotipli bireylerde ise % 59,63 olarak saptanmıştır. Stabil ilerleyen hastalar da metastaz varlığı ve genotipler açısından değerlendirilince metastazı olmayanlarda genotipler arasında yaşam süreleri açısından fark olmadığı gözlenmiştir. Aynı şekilde uzak metastazı olan fakat daha yavaş seyirli, stabil hastalarda da genotipler arasında yaşam süreleri açısından fark olmadığı gözlenmiştir.

Hastalığı stabil seyreden bireyler, progresyon gösterenlerle karşılaştırıldığında progresyonlu hastalarda TT genotipi taşıyan bireylerin yaşam süresinin kısaltıldığı gözlenmiştir. Stabil seyir gösterenlerde ise genotip ve yaşam süresi bakımından fark bulunmamıştır. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber, TT genotipine sahip, metastazı olan ve hastalığı progresyon gösteren bireylerde ölümler daha erken gerçekteşmektedir. Evre I ve II'de yer alan CC ve CT genotipli hastaların sağkalım olasılıkları oldukça yüksekken, TT genotipinde ise anlamlı oranda düşüktür. Evre III-IV'de ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da evrenin yükselmesi ile tüm genotiplerde aynı aylar için yaşama olasılıklarının azalmakta olduğu görölmektedir. İleri evrelerde de TT genotipinde yaşam süresinin diğer genotiplerden daha kısa olduğu izlenmektedir. İstatistiksel olarak fark bulunamamasının sebebi, hastaların değişik alt gruplara bölündüğünde her grupta yer alan örnek sayısının azlığı olarak yorumlanabilir.

Meme kanseri çalışmasında tümör boyutu, histolojik evre bakımından genotipik farklılık bulunmamıştır. Evre I-II hastalarda T allel taşıyıcılarında daha uzun metastazsız yaşam izlenmektedir. Evre III-IV hastalarda ise böyle bir izlem yoktur. Araştırmacılar bu durumun G proteinlerle yönlendirilen etkilere (immün yanıt, hücre farklılaşması vb.) bağlı olarak farklı tümör davranışı ile ilgili olabileceğini belirtmektedirler. Meme kanseri çalışmasında kanser progresyonu izlenmemiştir. GNB3 genotiplerinin metastazdaki rolünün yaşam süresi ve tedaviye yanıt açısından değerlendirilmesi yapılmamıştır (3).

Mesane kanserli hastalar ile yapılan benzer bir çalışma sonuçlarımızı desteklemektedir (110). Mesane kanserinde teşhis sırasında T allel taşıyıcılarının %47,9'unda düşük evre tümör mevcut iken, %61,2'sinde ileri evre tümör saptanmıştır. Yine kas invazyonu açısından incelendiğinde de T allel taşıyıcılarında kas invazyonunun daha fazla görüldüğü bildirilmiştir. Araştırmacılar bu nedenlerle, T allel taşıyıcılarında hastalığın daha invaziv seyrettiğini düşünmektedirler. Ortalama 45,3 aylık takip süresi sonrasında ise T alleli ve hastalık rekürrensi arasında ilişki gözlememişlerdir. Fakat metastaz ortaya çıkma zamanları açısından genotipler karşılaştırıldığında, CT/TT genotipinde ortalama 24,7 ay içerisinde metastaz izlenirken, CC genotipinde ise 45,3 ayda izlenmiştir. Yine progresyon için incelendiğinde T allel taşıyıcılarında daha kısa sürede yani ortalama 20,2 ayda progresyon izlenirken, bu süre CC genotipinde 29,9 aya çıkmaktadır. Araştırmacılar T allel taşıyıcılarında progresyon ve metastazın daha fazla ve daha erken görüldüğünü ve yine tümörle ilişkili ölümlerin daha erken gözlemlendiğini bildirmektedirler. TT genotipinde ölümler 30,6 ayda izlenirken, bu süre CC genotipinde 44 ay olarak bildirilmektedir. Yine çalışmada ilk teşhis anında T allel taşıyıcılarında daha ileri tümör derece ve evresinin izlendiğinden bahsedilmektedir. Hasta grupları sigara içen-içmeyen şeklinde ayrıldığında ise sigara içmeyen grupta farklı ilişkiler izlenmiştir. Sigara içmeyen T allel taşıyıcılarında tümör evresinin daha ileri olduğu (Odds oranı 2,396), ve yine teşhis anında tümör derecesinin de daha ileri olduğunu (Odds oranı 2,12) gözlemişlerdir. Sigara içmeyen hastalarda rekürrens zamanı T alleli ile ilişkili bulunmazken, T allel taşıyıcılarında metastazın üç kat daha erken ortaya çıktığı izlenmiştir. CT/TT genotipinde 19,7 ayda metastaz görülürken, CC'de 59,5 ayda görülmektedir. Progresyon zamanı da T allel taşıyıcılarında iki kat daha kısadır. CT/TT genotipinde ortalama 18,4 ayda progresyon gözlenirken, CC genotipinde bu süre 37,9 aydır. Tümöre bağlı ölümler ise T allel taşıyıcılarında 30,1 ayda izlenmektedir. Bu süre CC genotipi (52,4 ay) ile karşılaştırıldığında T allel taşıyıcılarında daha erken ölüm izlenmektedir. Sigara içmeyen grupta izlenen tüm bu ilişkilere sigara içen mesane kanserli hastalarda rastlanmaması ilgi çekicidir. Araştırmacılar Kaplan-Meier analizi ile CC genotipinin tümörle ilişkili yaşam süresi bakımından koruyucu etkiye neden olduğunu gözlemişlerdir. T allel taşıyıcıları da tümöre bağlı ölüm açısından CC'ye göre daha yüksek risk taşımaktadır (110).

Mesane kanserinden farklı olarak, C825T polimorfizminde C allel taşıyıcıları folliküler tiroid adenomu gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. C allelinde sinyal kapasitesi düşüktür. Onkositik tiroid tümörlerinde de tiroide özgü protein ve hormonların sentezi azalmıştır. Onkositik tiroid tümörlerinde T allel sıklığı %30,2 olarak bildirilmiştir. Onkositik tümörlerde ise onkositik olmayanlar ve kontrollerle karşılaştırıldığında C allelinin daha sık görüldüğü izlenmiştir. CC genotipine sahip bireyler TT ile karşılaştırıldığında onkositik tümör açısından Odds oranı 4,22 olarak bulunmuştur. Onkositik tümörler kontrollerle karşılaştırıldığında ise bu oran 3,40 olarak saptanmıştır. Araştırmacılar, onkositik hücrelerin düşük proliferasyon indeksine ve azalmış turn-over süresine sahip olduğunu belirtmektedirler. GNB3 gen polimorfizminde de C allelinde sinyal iletimi T allele göre azdır. Bu sebeple C allelinin onkositik tiroid tümörleri ile olan ilişkisi belirtilmiştir (112).

Foliküler ve papiller tiroid kanserleri ile yapılan bir çalışmada ise bu kanserler ve kontrol grubu arasında genotipik ve allel dağılımı açısından fark bulunmamıştır. Adenomlarda ise kontroller ve kanserler ile karşılaştırıldığında genotipik ve allel dağılımı bakımından fark gözlenmiştir. T allel frekansları sağlıklı kontrollerde %30, adenomlarda %21,9, folliküler tiroid kanserinde %32,1 ve papiller tiroid kanserinde ise %33,3 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada T allel sıklığının adenomadan minimal invazyona ve derin invazyona doğru gidildikçe arttığı bildirilmiştir. Tiroid adenomalarının kansere dönüşümünde T alleli, daha erken ve /veya sık kanser gelişimi ile ilgili olarak, olası bir faktör şeklinde nitelenebilmektedir (111).

Clar ve arkadaşları 2007 yılında meme kanserinde GNB3 C825T gen polimorfizminin kemik metastazı ile olan ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, meme kanserli ve kemik metastazı olan kadınlarda TT genotipinin kemik metastazı açısından koruyucu olduğunu bildirmişlerdir. Hastaları metastazı olmayan, kemik dışı metastazı olan ve kemik metastazı olan şeklinde gruplandırmışlardır. Metastazı olmayan meme kanserli hastalarda T allel sıklığı %32,1 iken, kemik dışı metastazı olanlarda %35 olarak bulunmuştur. T allel sıklığı kemik metastazı olanlarda ise %22,9'dur. TT genotipinin azalmış kemik metastazı riski ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir (Odds oranı 0,21). Metastazı olmayan grupta %37,8 CT, ve %13,3 TT genotip sıklığı bulunurken, kemik dışı metastazı olan grupta bu değerler %44,4 CT ve %12,8 TT şeklindedir. Homozigot veya heterozigot olarak T alleli taşıyanlar birlikte ele alındığında T allelinin kemik dışı

metastazı olan grupta daha fazla görüldüğü söylenebilmektedir. Fakat çalışma kemik metastazı üzerinde yoğunlaştığından ve bu şekilde bir karşılaştırma yapılmamış olmasından dolayı istatistiksel bir anlamdan söz edememekteyiz (117).

Lösemilerle ilgili olarak 2003 yılında yapılan bir çalışmada ise CC genotipi %46, CT % 42 ve TT genotipi % 12 sıklıkta izlenmiştir. Yapılan çalışmada teşhisten ilk kemoterapiye yanıt süresince CC ve CT/TT genotipleri arasında fark izlenmemiştir. Teşhisten ilk kemoterapiye dek geçen süre CC genotipinde ortalama 34,5 ay iken, CT/TT genotiplerinde 32,5 aydır. İlk kez kemoterapiye ihtiyaç gösteren hasta oranı CC genotipinde % 45,24 (n=19/42) iken CT/TT genotiplerinde ise % 50 (n=25/50) olarak izlenmiştir. İlk kemoterapiye yanıt CC genotipinde % 58 tam remisyon, % 16 progresyon şeklinde iken, CT/TT genotipinde % 68 tam remisyon ve % 12 progresyon şeklindedir. İkinci kemoterapiye ihtiyaç gösterenler CC genotipinde %56,3 oranında iken, CT/TT genotiplerinde % 43,8 olarak bulunmuştur. Allelik dağılımlar açısından ise GNB3 gen polimorfizmi ile kronik lenfositler lösemi gelişimi açısından fark bulunmamıştır. C allel taşıyıcılarında relaps ve ikinci kemoterapi ihtiyacı olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, C825T polimorfizminin kemoterapi yanıtını içeren sinyal ileti yollarının fonksiyonlarını düzenlediğini belirtmektedir. Fakat sonuçlar solid organ tümörleri ile yapılan çalışmalardan farklılık göstermektedir (118).

İki tip büyüme hormonu reseptörü, mitojenik uyarılara yanıt olarak işbirliği içindedir, bunlar reseptör tirozin kinazlar ve G protein bağlı reseptörlerdir. Hücreler hücre döngüsünün düzenlenmesi için sınırlı sayıda sinyal yolunu kullanırlar. Mitojenler içinse durum farklıdır ve pek çok hücre yüzey reseptörü, farklı kombinasyonlar ile sinyalizasyonu sağlarlar. Birçok reseptör ve onların efektör yolları pek çok noktada çakışır. Fakat bu yolların oldukça kompleks olması nedeniyle sinyal ileti mekanizmaları net olarak anlaşılammıştır (119). Kemokinler düşük molekül ağırlıklı sitokinlerdir ve farklı hücre tiplerine etki etmektedirler. Her ne kadar lökositleri çekme işlevleri en iyi bilinen fonksiyonları olsa da, tümörle ilişkili olaylarda örneğin büyüme, anjiyogenez ve metastazda da rolleri vardır. Kemokinler etkilerini, G protein bağlı reseptörler (örneğin Gi) üzerinden göstermektedirler (120,121). Kemokinlerin ve reseptörlerinin tümör patofizyolojisindeki rolleri oldukça kritiktir. Bazı kemokinler tümör büyümesi ve metastazı tetiklerken, bazıları antitümör aktiviteyi artırmaktadır. Bu zıt etkileri, kemokinlerin tümör hücreleri ve onların mikroçevreleri arasında anahtar

mediatörler olduklarını ve ayrıca tümör progresyon ve metastazında kritik rolleri oynadıklarını göstermektedir. Son yıllarda metastatik yolaklar incelendiğinde kemokinlerin burada önemli bir rolü olduğu ve hem tümör hücreleri hem de metastaz bölgesindeki konakçı hücrelerce eksprese edildikleri gözlenmiştir (120).

Kemokinler, tümör hücrelerince üretilip, lökosit infiltrasyonu ve proliferasyonunun artışına neden olmaktadır. Ayrıca mikro çevreyi vaskularizasyonu tetikleyerek etkileyip, spesifik reseptörlerini uyararak tümör hücrelerinin bağlanma kapasitesini artırmakta ve dolaşıma geçmelerine, uzak organ metastazı yapmalarına neden olmaktadır (120). Kemokinler, lökosit trafiğini düzenleyen küçük proteinlerdir. Lökositlerin dokulara girişi ise metastatik tümör hücrelerinin dokulara invazyonu ile benzerlikler taşımaktadır (121). Kemokinlerin ve kemokin reseptörlerinin artmış ekspresyonu kanserde önemli bir noktadır. Kemokinler ve reseptörleri kanser progresyon ve metastazında önemlidir ve genellikle kötü prognoz ile ilişkilidir (120). Bu alanda yapılacak çalışmalarla kemokin ve reseptör ekspresyonları ile ilgili lokal immün yanıt, anjiyogenez, tümör büyümesi ve metastaz açısından yeni ufuklar açılmasına yol açacaktır. Buna göre tümör örneklerindeki kemokinlerin ve reseptörlerinin ekspresyonlarının ölçümünün rölatif tümör agresifliğinin bir biyobelirteci olabileceği savunulmaktadır. Kemokin reseptör yolaklarının düzenlenme mekanizmalarının anlaşılması, prognoz ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır (120). Kemokin reseptörleri sadece lökositlerce değil, aynı zamanda epitel hücreleri ve çeşitli karsinomlarca da eksprese edilmektedir (122,123). Zeelenberg ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada kolon karsinoma hücrelerinde kemokin reseptörlerinin (CXCR4) upregüle olduğunu ve izole metastatik hücrelerde CXCR4 sinyallerinin proliferasyonu başlattığını göstermişlerdir (121). Yine bu çalışmada CXCR4 reseptör inhibitörlerinin mikrometastazları inhibe etmekte önemli antikanser ajanlar olduğu gösterilmiştir (121). Her ne kadar kemokinler, tümör hücre büyümesi, anjiyogenez ve malign hücrelerdeki konakçı immün yanıtı ile ilişkili ise de, Müller ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kemokinlerin direkt olarak tümör hücre göçü ve invazyonu ile metastazı tetiklediğini göstermişlerdir (124). Kemokinler G protein bağlı reseptörlerle etkileşirler ve metastatik tümör hücreleri de bu olaya dahildir (125). Metastatik meme kanseri hücreleri yüksek düzeylerde kemokin reseptörü (CCR4 ve 7) eksprese ederler. Kemokin reseptörlerine ait ligandlar da özellikle metastazın sık

görüldüğü bölgeler olan lenf nodları, akciğer, karaciğer ve kemik iliğinden eksprese edilmektedir. Kemokinler ayrıca anjiyogenezin de potent indükleyicileridir (126).

Kemotaksis enflamatuvar ve immün cevaplarda önemli bir mekanizmadır. Kemotaksis, Gi bağı reseptörler (dopamin ve opioid reseptörleri) ile yönlendirilir (127). GNB3 gen polimorfizminde ise Gi protein aktivasyonu meydana gelmektedir (17). Sinyal ileti yollarının sürekli uyarılması, sindirim epitel hücreleri, dokular ve immün hücrelerde lokal enflamasyondan neoplastik progresyona kadar değişen anarşik fonksiyonların oluşumu ile ilişkilidir (128). Enfeksiyon veya doku hasarı bölgesine gitmek için, enflamatuvar bir hücrenin kemokinlere ihtiyacı vardır. Boğmaca (pertussis) toksini ile inhibe edilen Gi proteinleri kemotaktik sinyallerin kontrolünde önem taşımaktadır (129).

Gβ3s varyantının yapısı, heterotrimerik kompleks oluşum yeteneğini azaltmaktadır. Bu nedenle daha uzun süre aktivite göstermektedir. Bu varyant Gβ proteininin tüm aktivitelerini gösterir, Gα ve Gγ proteinleriyle etkileşimi vardır (99). GNB3 825T allel taşıyıcılarında βs alt birimi Gα_{i2} ve Gγ₅ ile beraber fonksiyon göstermektedir (10). Sf9 insekt hücrelerinde, Gβ3s varyantının G protein aktivasyonu şeklindeki fonksiyonunu sadece Gα_i ve Gγ alt birimleri ile yaptığı kombinasyonlarda artırmakta olduğu gözlenmiştir (93).

GNB3 geni sıklıkla beyin, kolon, göz, germ hücre, kalp, akciğer ve pankreas ile ilişkilidir (75). G protein alt birimlerinin ekspresyon, protein yapı ve aktivasyonundaki anormallikler, over tümörleri, nöroendokrin tümörler ile ratlarda azoksimetan ile indüklenen deneysel kolonik neoplazm modelleri gibi patolojilerde bildirilmiştir (130,131). Gβγ altbirimlerinin fazla ekspresyonu invazivliği indüklemektedir. Gβγ dimerleri, invazyon yollarında onkogenler ve epigenik faktörler tarafından indüklenen pozitif efektörlerdir. Gα_o/α_i ve Gβγ şeklindeki farklı fonksiyonlar hücrel invazyonla ilişkili sinyal yollarında farklı etkiler vermektedir ve bu yollar antikanser tedavisinde önemli hedef oluşturmaktadır (128). Gβγ kemotaksisin esansiyel bir medyatördür. βγ ünitesi kemotaksis cevabını fosfoinozitol-3 kinaz (PI3K), fosfolipaz C, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) üzerinden göstermektedir (127). Gβγ dimerleri ayrıca hücrel invazyonda rolü olan çeşitli sinyal yollarının aktivasyonları indüklemektedir. Bunlar Rho-benzeri küçük (small) G proteinleri, PI3K, fosfolipaz C/protein kinaz C yolağıdır (132).

Gβγ dimeri, MAPK yolağını düzenlemekte ve böylelikle hücrel proliferasyonu da etkilemektedir. Fakat bunun altında yatan mekanizmalar henüz anlaşılamamıştır. Farklı hücreler, farklı mekanizmalar kullanarak ve farklı Gβγ dimerleri aracılığıyla MAPK aktivasyonunu sağlamaktadırlar. βγ dimerleri, özellikle hayatta kalım ve proliferasyon ile ilişkili sinyal yollarında yer almaktadırlar (75). GPCR ve G proteinlerinin MAPK aktivitesini regüle etmesi, tümöröenez, hücre bölünmesi ve farklılaşması olaylarına karmaşıklık kazandırmaktadır. Pek çok mitojenik sinyal, G proteinleri ve reseptör tirozin kinazlar tarafından yönlendirilen ortak yollardan kaynaklanmaktadır (133).

Pek çok ekstrasellüler uyaran ras aktivasyonunu sağlayabilmektedir. Bunlar reseptör- reseptör olmayan tirozin kinazlar, G protein bağı reseptörler ve integrinlerdir. Pek çok onkogen örneğın ras, sadece malign dönüşümde değil, aynı zamanda metastaz olayının çeşitli basamaklarında da rol alır. Çeşitli metastaz baskılayıcı genler ise etkilerini ERK 1/2 aktivasyonunu azaltarak ya da G protein bağı reseptör ligandları aracılığıyla yapar (134). Gβγ bağımlı yollar ve reseptör tirozin kinaz (RTK) bağımlı yollar, küçük G protein aktivasyonunda birleşmektedir. Gβγ dimeri ise, Ras aktivasyon kompleksinin yapılanmasında rol almaktadır (135).

Hayatta kalma ile ilişkili sinyal yollarında RTK, GPCR ve reseptör olmayan tirozin kinazlar rol alırlar. Tüm bu yollar ise tek bir molekülün aktivasyonunda birleşirler: Fosfoinozitol 3 kinaz (PI3K). Gβγ dimerinin ve PI3K'ın büyümedeki önemi transgenik hayvanlarda gösterilmiştir (75). PI3K, sinyalizasyondaki görevlerini ikincil haberciler üzerinden yürütmektedir. Farede, bu tümör baskılayıcı genlerden birinin eksikliği ile apoptozis oluşumunun durduğu ve apoptotik uyarılara direnç geliştiği izlenmiştir (136).

Kolorektal kanserlerde ras/MAPK yolağı dışında PI3K/Akt yolağı da atipik olarak aktive olmaktadır. Bu hücre büyümesi, proliferasyonu ve apoptozis ile ilgili metabolik yolların atipik aktivasyonları kolorektal kanserlerle ilişkili bulunmuştur (137). Yapılan çalışmalarda bir serin/treonin kinaz olan Akt aktivasyonunun kolorektal kanser progresyonunda rolü olduğu ve p-Akt inhibitörlerinin bu kanserlerin tedavisine bir ışık tutabileceğini bildirilmiştir (138). Akt aktivasyonu PTEN genleri ile de negatif olarak düzenlenmektedir (139).

Sinyal yolları ile ilgili bilinenler her ne kadar yıllar içinde yapılan araştırmalar ile artıyor olsa da, burada yer alan yolların karmaşıklığı henüz çözülebilmemiş değildir. Yukarıda sözü edilen pek çok yolağın G proteinleri ile ilişkisi bilinmektedir. Bunların bir kısmı ise heterotrimerik G proteinlerinin $\beta\gamma$ alt birimlerinde yönlendirilmektedir. Fakat 825 T alleli ile ilişkili G β 3s varyantının bu yolların herhangi bir aşamasında rolü olup olmadığı kesin değildir. N-formil-metiyonil-lözil-fenilalanin (fMLP) isimli potent bir nötrofil kemoatraktan madde ile uyarılan nötrofil kemotaksisinin T allel taşıyıcılarında artmış olduğu bilinmektedir (13). Bu sonuçla bağlantılı olarak kemokinle uyarılan tümör yayılım mekanizmalarının da bu allel ile ilgili olabileceği akla gelen ilk soru olmaktadır. Konu ile ilgili değişik varsayımlar üzerinde durmak gerekirse, eğer mitojenik sinyal yollarının aktivasyonu G β 3 alt birimi üzerinden değilse, belki de G β 3s varyantı Gai2 ile kombinasyon gösterip yolağı bu yol üzerinden aktive edebilmektedir. Ya da doğal (wild) tip G β 3'ün normal şartlarda uyaramadığı yollar, T alleliyle ilişkili G β 3s varyantının sinyal iletimini artırıcı etkisi sebebiyle uyarılabiliyor olabilir. Çalışmamız sırasında elde edilen verilere dayanarak üzerinde yoğunlaştığımız GNB3 825T alleli ve tümör progresyonu ve metastaz ilişkisine ait olası mekanizmaları açıklayamamaktayız. Fakat elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda GNB3 825T allelinin gastrointestinal kanserlerde progresyon ölçütleri arasında yer alabileceğini ve hastalık sonucunun tahmininde kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Örneğin kolorektal kanserler için kanser prognozu evre ve tümör derecesine bağlıdır. Fakat benzer histopatolojik özellik gösteren tümörlerin klinik yansımaları farklı olmaktadır. Yine bu hastalarda tedavi sonrasında izlenen tümör rekürrensi önemli bir sorun oluşturmaktadır (140). Kolorektal kanserlerin gelişimi ve metastazları ile ilgili birçok genetik çalışmalar yapılmakla beraber iki önemli yolak kolorektal karsinogenez ile ilişkili bulunmuştur. Bunlardan birincisi kromozomal instabilite yolu (APC= adenomatozis polipozis koli; K-ras, β -katenin, P 53, SMAD, DCC mutasyonları burada yer almaktadır) ve diğeri ise mikrosatellit instabilitedir (TGF β RII, BAX, IGFIIR ile ilişkili mutasyonlardır). Kolorektal kanserde invazyon/metastaz ile ilişkili gen defektleri ise ekstrasellüler matriks yıkımı, adezyon, anjiyogenez, hücre büyümesi aşamalarında ortaya çıkmaktadır (141). Tıpkı bu yeni biyobelirteçler gibi, yapılacak ileri çalışmalarla desteklendiğinde ve ilgili sinyal yollarının bir miktar aydınlatılmasıyla 825T allelinin de tümör progresyonu için kullanılabilecek yeni bir belirteç olabileceği kamsındayız.

Tümör evre, progresyon ve metastazı ile ilgili yapılan çalışmaların amacı klinik takibe ve tedaviye yardımcı olacak yeni laboratuvar ve/veya genetik belirteçlerin bulunmasıdır. Hastalık başlangıcında aynı evre ve tümör derecesine sahip olan hastalarda, hastalığın ilerlemesi ve tedavi yanıtları farklılık gösterebilmektedir. Biz de GNB3 825T allelinin prognostik bir belirteç olabileceğini düşünmekle beraber, konu ile ilgili yanıtlanması gereken sorular olduğu gerçeğini de göz ardı etmemekteyiz. Bunlardan birisi bu allelin kanser progresyonu ile olan ilişkisinin rastlantısal olup olmadığının saptanmasıdır. Bir diğer soru ise bu polimorfizm üzerine etki edebilecek diğer faktörlerin araştırılmasıdır. Bir gendeki farklı lokuslar üzerinde yer alan alleller arasındaki rastlantısal olmayan ilişkiler bağlantı dengesizliği olarak adlandırılmaktadır. GNB3 geni ile ilgili C 825T, G 814A, A 657T, C 1429T, A (-350)G gibi polimorfizmler bilinmektedir. Bunlardan C1429T ve A-350G mutasyonları fonksiyonel olarak sessizdir (9,109). Roskopf D ve arkadaşları yaptıkları çalışmada GNB3 geni 825T alleli ile 3882C varyantı, 5249A alleli ve 6496CACA insersiyonu arasında bir bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) tespit etmişlerdir. Bu durum beyaz ırkta ayrıca 825T alleli ile 1429T alleli arasında da görülmektedir. Bu sebeple 825T allel taşıyıcıları GNB3 geninde tek değil, aynı anda dört veya beş adet tanımlanmış değişimle karşı karşıyadır. Gen üzerindeki birden fazla baz değişikliğinin pre-mRNA'nın ikincil yapısındaki etkisi, tek nükleotid polimorfizminden daha güçlü olmaktadır (91).

Çalışma sonucunda belirtmiş olduğumuz görüşlerin kesin mekanizması açıklanamamakla birlikte, G protein bağlı reseptör ve ilişkili sinyal yollarının kanser invazyon ve metastaz sürecinde rolü olduğu düşünülebilmektedir. Yapılacak ileri ve ayrıntılı çalışmalar G protein bağlı reseptör ailesinin, kanser, metastaz ve progresyon üzerindeki olası rollerinin açıklanması için gereklidir. Tüm bunların yanı sıra GNB3 geni ile kodlanan G protein $\beta 3$ alt biriminin, G proteinlerinin yer aldığı bu süreçteki olası rolünün de net bir biçimde ortaya konulması gereklidir. Elde edilen sonuçların ya genetik varyasyonun direkt etkisi olduğu ya da GNB3 lokusundaki tam bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) ile ilişkili olduğu düşünülebilir. Bu nedenle çalışmamızın tüm GNB3 haplotipleri ile desteklenmesinin de gerekli olduğu görülmektedir. 1998 yılında GNB3 gen polimorfizminin tanımlanmasının ardından konu ile ilgili yapılan çalışmalara son dönemde kanserle ilişkisini değerlendiren çalışmalar da eklenmiştir. Bu çalışmamız ile hem bu konuda yapılmış sınırlı sayıdaki

araştırmalara katkıda bulunmuş, hem de ÷lkemiz için henüz belirlenmemiş olan T allel frekansını da tespit etmiş bulunmaktayız. Örnek sayısının az olmasının çalışmamızı sınırlandırdığı düşüncesiyle gastrointestinal kanserli örnek sayısının genişletilmesini ve yaşam süresi analizlerini özofagus, mide, kolorektal ve pankreas kanserli hastalarda da ayrı ayrı ve daha ayrıntılı olarak tekrarlamayı amaçlamaktayız.

Sonuç olarak, G protein $\beta 3$ altbirimini kodlayan GNB3 genindeki C825T polimorfizminin gastrointestinal kanser hastalarında progresyon takibinde kullanılabilir bir prognostik belirteç adayı olabileceği gözlenmektedir. Konuyla ilgili yapılan ve yapılacak her araştırmanın, üzerinde çok fazla çalışılan bir hastalık olan kanserin teşhis, prognoz ve tedavisine katkıda bulunacağı bir gerçektir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1- Neoplastik büyüme, malign hücre popülasyonunun kontrolsüz yayılım gösterdiği otonom bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Neoplazi patogenezinde pek çok faktör rol oynamakla birlikte, karmaşık moleküler mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılammıştır.

2- Gastrointestinal kanserlerin oluşumunda rol alan spesifik etiyolojik ve patojenik mekanizmalar oldukça kompleks ve heterojendir. Bu etiyolojik faktörlerden birisi ve son yıllarda en fazla üzerinde çalışılanı ise genetik mekanizmalardır.

3- Heterotrimerik G proteinleri transmembran reseptörlerinin bir kısmının önemli bir bileşenidir ve hücre içi sinyal iletiminin düzenlenmesinde rol alırlar. Hücre büyümesi ve mitozdaki rolleri nedeniyle heterotrimerik G proteinlerinin tümör gelişimi ve büyümesi ile ilişkili olduğu düşünülebilmektedir.

4- GNB3 geni G protein $\beta 3$ alt birimini kodlayan genidir. Bu gene ait çeşitli polimorfizmler üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bunların arasında ise en önemlisi ve çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş olanı C 825T polimorfizmidir.

5- Polimorfizm sonucunda GNB3 geni 10. ekzonda 825. nükleotidde C-T şeklinde tek baz değişikliği meydana gelir. Ekzon 9'da ise 123 baz çiftlik bir delesyonla sonuçlanan bir alternatif splicing oluşur. Bu durum wild type (CC) genotipe göre 41 aminoasitlik bir kayıpla sonuçlanır. T allel taşıyıcılarında izlenen splice varyant fonksiyonel olarak aktiftir ve sinyal iletimindeki artış ile ilişkilidir.

6- Çalışma sonucunda sağlıklı popülasyonda GNB3 825T allel frekansı % 34,29 olarak izlenmiştir. Bu sonuç, ülkemiz sınırları içinde yapılan bir araştırma sonucunda bildirilen ilk değerdir ve diğer ülkelerdeki T allel frekansı ile karşılaştırmak açısından önem taşımaktadır.

7- Hasta ve kontrol grupları arasında genotip ve allel frekansları bakımından anlamlı bir değişimin olmadığı yani T allel taşıyıcılarının kanser riski açısından kontrol grubundan farklı olmadığı görülmüştür.

8- Gastrointestinal kanserli hastalarda T alleli ile hastalık evresi ve uzak metastaz varlığı arasında ise anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür. T allel taşıyan hastalarda C allel taşıyıcılarına göre, hastalık evresi ve metastaz gelişiminde artış olduğu gözlenmiştir.

9- Kanser hastalarının tedavi sonrası takipleri yapıldığında da hastalığı progresyon gösterenlerden TT genotipi taşıyanların yaşam süresinin kıaldığı gözlenmiştir.

10-Çalışma sonucunda belirtmiş olduğumuz görüşlerin kesin mekanizması açıklanamamakla birlikte, G protein bağlı reseptör ve ilişkili sinyal yollarının kanser invazyon ve metastaz sürecinde rolü olduğu düşünülebilmektedir.

11- Sonuç olarak, G protein $\beta 3$ altbirimini kodlayan GNB3 genindeki C825T polimorfizminin gastrointestinal kanser hastalarında progresyon takibinde kullanılabilir bir prognostik belirteç adayı olabileceği gözlenmektedir.

12-Yapılacak ileri ve ayrıntılı alışmalar G protein bağlı reseptör ailesinin, kanser, metastaz ve progresyon üzerindeki olası rollerinin açıklanması için gereklidir. Tüm bunların yanı sıra GNB3 geni ile kodlanan G protein $\beta 3$ alt biriminin, G proteinlerinin yer aldığı bu süreçteki olası rolünün de net bir biçimde ortaya konulması gereklidir.

13- Tez çalışmamızın klinik olarak oldukça önemli olan kanser progresyonu konusundaki bilgilere katkıda bulunacağı düşünölmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Loktionov A.** Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. *Cancer Letters*, **2004** ; 208: 1-33.
2. **Hadden JW.** Immunodeficiency and cancer: prospects for correction. *Int. immunopharmacology*, **2003**; 3:1061-1071.
3. **Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, et al.** The 825C>T polymorphism of the G-protein beta-3 subunit gene (GNB3) and breast cancer. *Cancer Letters*, **2004**; 206: 59-62.
4. **Hamm HE.** The many faces of G protein signaling. *The journal of biological chemistry*, **1998**; 273(2): 669-672.
5. **Downes GB, Gautam N.** The G protein subunit gene families. *Genomics*, **1999**; 62: 544-552.
6. **Dhanasekaran N, Heasley LE, Johnson GL.** G protein-coupled receptor systems involved in cell growth and oncogenesis. *Endocrine reviews*, **1995**; 16 (3): 259-270.
7. **Vallar L.** Oncogenic role of heterotrimeric G proteins. *Cancer surveys*, **1996**; 27: 352-338.
8. **Lania A, Mantovani G, Spada A.** G protein mutations in endocrine diseases. *European Journal of Endocrinology*, **2001**; 145: 543-559.
9. **Roskopf D, Busch S, Manthey I, Siffert W.** G protein $\beta 3$ gene, structure, promoter, and additional polymorphisms. *Hypertension*, **2000**; 36 (1): 33-41.
10. **Siffert W.** G protein $\beta 3$ subunit 825T allele, hypertension, obesity, and diabetic nephropathy. *Nephrol dial transplant*, **2000**; 15: 1298-1306.
11. **Hegele RA, Harris SB, Hanley AJG, Cao H, Zinman B.** G protein $\beta 3$ subunit gene variant and blood pressure variation in Canadian Oji-Cree. *Hypertension*, **1998**; 32: 688-692.
12. **Morrison AC, Doris PA, Folsom AR, Nieto FJ, Boerwinkle E.** G-protein $\beta 3$ subunit and α -adducin polymorphisms and risk of subclinical and clinical stroke. *Stroke*. **2001**; 32 (4): 822-829.
13. **Virchow S, Ansorge N, Rübben H, Siffert G, Siffert W.** Enhanced f MLP-stimulated chemotaxis in human neutrophils from individuals carrying the G protein $\beta 3$ subunit 825 T-allele. *FEBS letters*. **1998**; 436: 155-158.
14. **Lindemann M, Virchow S, Ramann F, Barsegian V, et al.** The G protein $\beta 3$ subunit 825 T-allele is a genetic marker for enhanced T cell response. *FEBS letters*. **2001**; 495: 82-86.
15. **Von Beckerath N, Schusterschitz Y, Koch W, Griebner K, et al.** G protein beta 3 subunit 825T allele carriage and risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. **2003**; 167: 135-139.
16. **Siffert W, Forster P, Jöckel KH, et al.** Worldwide ethnic distribution of the G protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals. *J Am Soc Nephrol*. **1999**; 10: 1921-1930.

17. **Lindemann M, Barsegian V, Siffert W, Ferencik S, et al.** Role of G protein β 3 subunit C825T and HLA Class II polymorphisms in the immune response after HBV vaccination. *Virology*. **2002**; 297: 245-252.
18. **Öfner D, Zitt M, Menzel HJ, et al.** The 825C allele of the gene GNB3 encoding the G-protein β 3 subunit is associated with an increased risk for developing colorectal cancer. *Eur. J. Hum. Genet.* **2002**; 10: S105.
19. **Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell*. **2000**; 100: 57-70.
20. The interaction between the immune system and tumors. **Erişim:** <http://www.anticancer.net/resan/basis.html>. Erişim tarihi: 12.01.2007
21. **Bae AE, Brown SJ.** Etiology of cancer: cancer genetics. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Eds. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 6th Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams&Williams, **2001**: 207-217.
22. **Doğan AL, Güç D.** Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*. **2004**; 35: 34-42.
23. **Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G.** Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochem Pharmacol.* **2006**; 72 (11): 1605-21.
24. **Ben-Baruch A.** The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* **2006**; 25(3):357-71.
25. **Schrump DS, Altorki NK, Forastiere AA, Minsky BD.** Cancer of the esophagus. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Eds. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 6th Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams&Williams, **2001**: 1051-1091.
26. **Krevsky B.** Tumors of the esophagus. In: Haubrich WS, Schaffner F, Berk JE. Eds. *Bockus Gastroenterology Volume I*. 5th Ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders company, **1995**: 534-557.
27. **Peters JH, DeMeester TR.** Esophagus and diaphragmatic hernia. In: Brunicaudi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Pollock RE Eds. *Schwartz's Principles of surgery*. 8th Ed. USA: The McGraw-Hill Companies, **2005**: 835-931.
28. **Fearon ER.** Molecular biology of gastrointestinal cancers. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Eds. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 6th Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams&Williams, **2001**: 1037-1051.
29. **Kelley JR, Duggan JM.** Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol.* **2003**;56:1-9.
30. **Demirer T, İçli F, Uzunalimoğlu Ö, Küçük M.** Diet and stomach cancer incidence. *Cancer*. **1990**; 65: 2344-2348.
31. **Kaaks R, Tuyns AJ, Haelterman M, Riboli E** Nutrient intake patterns and gastric cancer risk: A case-control study in Belgium. *Int J Cancer*. **1998**; 78: 415-420.
32. **Davis GR.** Neoplasm of the stomach. *Gastrointestinal Disease*. Gastrointestinal Disease. 5th Ed., Philadelphia: WB Saunders Company, **1993**: 763-782.
33. **Townsend CM, Beauchamp RA, Evers BM, Mattox KL.** Textbook of Surgery. 8th Ed., Newyork: WB Saunders Company, **2001**: 855-864.

34. **Elder JB.** Carcinoma of the stomach. In: Haubrich WS, Schaffner F, Berk JE. Eds. *Bockus Gastroenterology Volume I*. 5th Ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders company, **1995**: 859-874.
35. **Sasazuki S, Sasaki S, Tsugane S.** Cigarette smoking, alcohol consumption and subsequent gastric cancer risk by subsite and histologic type. *Int J Cancer*. **2002**;101:560-566.
36. **Hemminki K, Jiang Y.** Familial and second gastric carcinomas. *Cancer*. **2002**; 94 (4): 1157-1165.
37. **Dempsey DT.** Stomach. In: Brunicaardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Pollock RE Eds. *Schwartz's Principles of surgery*. 8th Ed. USA: The McGraw-Hill Companies, **2005**: 933-995.
38. **Luk GD.** Tumors of the stomach. *Gastrointestinal and Liver Disease*. 6th Ed. Philadelphia: WB Saunders Company, **1998**: 733-754.
39. **Chen MJ, Chiou YY, Wu DC, Wu SL.** Lifestyle habits and gastric cancer in a hospital-based case-control study in Taiwan. *Am J Gastroenterol*. **2000**; 95(11): 3242-3249.
40. **Pierre EN, Ott MJ.** Gastric Cancer. *Current Surgical Therapy*, 7th Ed. St. Louis: Mosley, **2001**: 105-112.
41. **Karpeh MS, Kelsen DP, Teper JE.** Cancer of the stomach. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Eds. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 6th Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams&Williams, **2001**: 1092-1126.
42. **Becker K-F, Keller G, Hoefler H.** The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol*. **2000**; 9: 5-11.
43. **Tahara E.** Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol*. **1993**; 119: 265-272.
44. **Yasui W, Oue N, Kuniyasu H, Ito R, Tahara E, Yokozaki H.** Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer*. **2001**; 4: 113-121.
45. **Yokozaki H, Yasui W, Tahara E.** Genetic and epigenetic changes in stomach Cancer. *Int Rev cytol*. **2001**; 204: 49-95.
46. **Chan AO, Luk JM, Hui WM, Lam SK.** Molecular biology of gastric carcinoma: from laboratory to bedside. *J Gastroenterol Hepatol*. **1999**; 14: 1150-1160.
47. **Chan AO, Wong BC, Lam S.** Gastric Cancer: past, present and future. *Can J Gastroenterol*. **2001**; 15(7): 469-474.
48. **Höfler H, Becker K.** Molecular mechanism of carcinogenesis in gastric cancer. *Recent Results Cancer Res*. **2003**; 162: 65-72.
49. **Hirohashi S, Sugimura T.** Genetic alterations in human gastric cancer. *Cancer Cells*. **1991**; 3(2): 49-52.
50. **Skibber JM, Minsky BD, Hoff PM.** Cancer of the colon. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Eds. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 6th Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams&Williams, **2001**: 1216-1271.
51. **Levin B, Raijman I.** Malignant tumors of the colon and rectum. In: Haubrich WS, Schaffner F, Berk JE. Eds. *Bockus Gastroenterology Volume II*. 5th Ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders company, **1995**: 1744-1772.

52. **Bullard KM, Rothenberger DA.** Colon, rectum and anus. In: Brunnicardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Pollock RE Eds. *Schwartz's Principles of surgery*. 8th Ed. USA: The McGraw-Hill Companies, **2005**: 1055-1117.
53. **Evans DB, Abbruzzese JL, Willett CG.** Cancer of the pancreas. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Eds. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 6th Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams&Williams, **2001**: 1126-1161.
54. **Fisher WE, Andersen DK, Bell RH, Saluja AK, Brunnicardi FC.** Pancreas. In: Brunnicardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Pollock RE Eds. *Schwartz's Principles of surgery*. 8th Ed. USA: The McGraw-Hill Companies, **2005**: 1221-1296.
55. **McCormick F.** Signalling networks that cause cancer. *Trends in cell biol.* **1999**; 9(12): M53-M56.
56. **Vander A, Sherman J, Luciano D.** *Human Physiology*. 8th Ed, New York: USA Mc Graw Hill, Inc. **2000**: 159-174.
57. **Granner DK.** Hormon Etkisi. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell V Eds. *Harper'in biyokimyası*. 24. Baskı. İstanbul: Barış Kitapevi, **1998**: 536-550.
58. **Katzung BG.** *Basic & Clinical Pharmacology*. 7th Ed., Stanford: USA Appleton& Lange Publishing, **1998**: 17-27.
59. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.** *Molecular Biology of The Cell*. 3rd. Ed., New York: USA Garland Publishing, Inc. **1994**: 721-785.
60. **Foreman JC.** Introduction to signal transduction. In: Foreman JC, Johansen T. Eds. *Textbook of receptor pharmacology*. 1st Ed. USA: CRC Press, Inc. **1996**: 153-158.
61. **Waller DG, Renwick AG, Hillier K.** *Medical Pharmacology and Therapeutics*. 1st. Ed., Spain: W.B. Saunders. **2001**: 3-16.
62. **Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Gardner P.** *Pharmacology*. 4th Ed, Philadelphia: USA Churchill, Livingstone Company. **2001**: 19-49.
63. **Spada A, Vallar L, Faglia G.** G protein oncogenes in pituitary tumors. *Trends Endocrinol Metab.* **1992**; 3: 355-360.
64. **Gutkind JS.** The pathways connecting G-protein coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *The journal of biological chemistry.* **1998**; 273 (4): 1839-42.
65. **Erişim:**http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Scientific_Resources/Pathway_Slides_Charts/Diversity_of_G_Protein_Coupled_Receptor_Signal_TDP.html. **Erişim tarihi:** 22.11.2007.
66. **Sprang SR.** G protein mechanisms: Insights from structural analysis. *Ann Rev Biochem.* **1997**; 66: 639-678.
67. **Wicland T, Mittmann C.** Regulators of G-protein signalling: multifunctional proteins with impact on signalling in the cardiovascular system. *Pharmacology&Therapeutics.* **2003**; 97 (2): 95-115.
68. **Ark M, Kubat H, Yılmaz N.** Küçük GTP bağlayıcı proteinler. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* **2003**; 4 (2): 161-168.

69. **Paduch M, Jelen F, Otlewski J.** Structure of small G proteins and their regulators. *Acta biochimica polonica*. **2001**; 48(4): 829-850.
70. **Carr-Schmid A, Valente L, Loik VI, Williams T, Starita LM, Kinzy TG.** Mutations in elongation factor 1beta, a guanine nucleotide exchange factor, enhance translational fidelity. *Mol Cell Biol*. **1999**; 19(8):5257-66.
71. **Riis B, Rattan SI, Clark BF, Merrick WC.** Eucaryotic protein elongation factors. *Trends Biochem Sci*. **1990**; 15 (11): 420-424.
72. **Hermans E.** Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*. **2003**; 99(1): 25-44.
73. **Offermanns S.** G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol*. **2003**; 83(2): 101-30.
74. **Erişim:** http://faculty.smu.edu/svik/6312/figures/Fig3_8_3_15.html. **Erişim Tarihi:** 12.12.2007
75. **Schwindinger WF, Robishaw JD.** Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation. *Oncogene*. **2001**; 20(13): 1653-60.
76. **Willard FS, Crouch MF.** Nuclear and cytoskeletal translocation and localization of heterotrimeric G-proteins. *Immunol Cell Biol*. **2000**; 78(4): 387-94.
77. **Erişim:** <http://www.leffingwell.com/olfact3.htm>. **Erişim Tarihi:** 03.12.2007
78. **Erişim:** http://www.bmb.psu.edu/faculty/tan/lab/gallery_proteins.html. **Erişim Tarihi:** 03.12.2007
79. **Clapham DE, Neer EJ.** G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **1997**;37:167-203.
80. **Erişim:** <http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/pdb/gprot/gprot.htm>. **Erişim Tarihi:** 22.02.2007.
81. **Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ.** The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci*. **1999** ;24(5):181-5.
82. **Erişim:** http://www.bmb.psu.edu/faculty/tan/lab/gallery_proteins.html. **Erişim Tarihi:** 08.04.2007
83. **Erişim:** <http://www.science.mcmaster.ca/biopharm/bpharmj.htm>. **Erişim Tarihi:** 07.01.2008
84. **Bhavagan NV.** *Medical biochemistry*.4th Ed. Florida, USA: Harcourt/Academic Press, **2002**: 699-727.
85. **Erişim:** http://www.rvi.net/~fluoride/dose_is_the_poison/gpr.htm. **Erişim Tarihi:** 17.03.2007.
86. **Lowes VL, Ip NY, Wong YH.** Integration of signals from receptor tyrosine kinases and g protein-coupled receptors. *Neurosignals*. **2002** ;11(1):5-19.
87. **De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG.** The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **2000**; 40: 235-71.
88. **Bünemann M, Hosey MM.** G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol*. **1999**; 517 (1): 5-23.

89. Spiegel AM. Genetic basis of endocrine disease: Mutations in G proteins and G protein-coupled receptors in endocrine disease. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. **1996**; 81 (7): 2434-42.
90. Hinkle P. Receptors, G proteins and human disease. Erişim: <http://www.urmc.rochester.edu/phph/graduate/IND447/GPCRs.html>. Erişim Tarihi: 04.03.2007.
91. Rosskopf D, Manthey I, Siffert W. Identification and ethnic distribution of major haplotypes in the gene GNB3 encoding the G-protein beta3 subunit. *Pharmacogenetics*. **2002**; 12(3): 209-20.
92. Rosskopf D, Kielbik M, Manthey I, Bilmen G, Eisenhardt A, Siffert W. Characterization of the splice variant Gbeta3v of the human G-protein Gbeta3 subunit. *Biochim Biophys Acta*. **2003**; 1626(1-3): 33-42.
93. Siffert W, Rosskopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann HE, Jakobs KH, Horsthemke B. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet*. **1998**;18(1):45-8.
94. Siffert W. A single nucleotide polymorphism in G protein-a powerful pointer to several diseases. *Qiagen news*. **2000**; 2: 6-8.
95. Wascher TC, Paulweber B, Malaimare L, Stadlmayr A, Iglseeder B, Schmoelzer I, Renner W. Associations of a human G protein beta3 subunit dimorphism with insulin resistance and carotid atherosclerosis. *Stroke*. **2003**; 34(3): 605-9.
96. Rosskopf D, Manthey I, Habich C, Kielbik M, Eisenhardt A, Nikula C, Urban M, Kohnen S, Graf E, Ravens U, Siffert W. Identification and characterization of G beta 3s2, a novel splice variant of the G-protein beta 3 subunit. *Biochem J*. **2003**; 371(1): 223-32.
97. Suwazono Y, Kobayashi E, Uetani M, Miura K, Morikawa Y, Ishizaki M, Kido T, Nakagawa H, Nogawa K. G-protein beta3 subunit variant C825T is a risk factor for hypertension in Japanese females--a prospective cohort study over 5 years. *Ann Hum Genet*. **2006**; 70(6): 767-77.
98. Yamagishi K, Tanigawa T, Cui R, Tabata M, Ikeda A, Yao M, Shimamoto T, Iso H. G-protein beta-3 subunit C825T polymorphism, sodium and arterial blood pressure: a community-based study of Japanese men and women. *Ann Hum Genet*. **2006**; 70(6): 759-66.
99. Rosskopf D, Koch K, Habich C, Geerdes J, Ludwig A, Wilhelms S, Jakobs KH, Siffert W. Interaction of Gbeta3s, a splice variant of the G-protein Gbeta3, with Ggamma- and Galpha-proteins. *Cell Signal*. **2003**; 15(5): 479-88.
100. Ishikawa K, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K, Takami S, Nakata Y, Satoh H, Hisamichi S, Higaki J, Ogihara T. Human G-protein beta3 subunit variant is associated with serum potassium and total cholesterol levels but not with blood pressure. *Am J Hypertens*. **2000**; 13(2): 140-5.
101. Von Beckerath N, Kastrati A, Koch W, Böttiger C, Mehilli J, Seyfarth M, Schömig A. G protein beta3 subunit polymorphism and risk of thrombosis and restenosis following coronary stent placement. *Atherosclerosis*. **2000**; 149(1): 151-5.
102. Poch E, González D, Gómez-Angelats E, Enjuto M, Paré JC, Rivera F, de La Sierra A. G-Protein beta(3) subunit gene variant and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Hypertension*. **2000**;35(1): 214-8.

- 103. Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Boerwinkle E.** C825T polymorphism of the G protein beta(3)-subunit and antihypertensive response to a thiazide diuretic. *Hypertension*. **2001**; 37(2):739-43.
- 104. Yamamoto M, Abe M, Jin JJ, Wu Z, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J.** Association of GNB3 gene with pulse pressure and clustering of risk factors for cardiovascular disease in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun*. **2004**; 316(3): 744-8.
- 105. Bookout AL, Finney AE, Guo R, Poppel K, Koch WJ, Daaka Y.** Targeting G betagamma signaling to inhibit prostate tumor formation and growth. *J Biol Chem*. **2003**; 278(39): 37569-73.
- 106. Zagradisnik B, Bracic K, Varda NM, Kokalj Vokac N, Gregoric A.** G-protein beta3 subunit gene C825T polymorphism in patients with vesico-ureteric reflux. *Ann Genet*. **2004**; 47(3): 209-16.
- 107. Hengstenberg C, Schunkert H, Mayer B, Döring A, Löwel H, Hense HW, Fischer M, Riegger GA, Holmer SR.** Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene (GNB3) with arterial hypertension but not with myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. **2001**; 49(4): 820-7.
- 108. Erişim:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> **Erişim Tarihi:** 23.01.2007
- 109. Siffert W.** G protein polymorphisms in hypertension, atherosclerosis, and diabetes. *Annu Rev Med*. **2005**;56: 17-28.
- 110. Eisenhardt A, Siffert W, Roskopf D, Musch M, Mosters M, Roggenbuck U, Jöckel KH, Rübber H, Lümmer G.** Association study of the G-protein beta3 subunit C825T polymorphism with disease progression in patients with bladder cancer. *World J Urol*. **2005**; 23(4): 279-86.
- 111. Sheu SY, Görges R, Ensinger C, Ofner D, Farid NR, Siffert W, Schmid KW.** Different genotype distribution of the GNB3 C825T polymorphism of the G protein beta3 subunit in adenomas and differentiated thyroid carcinomas of follicular cell origin. *J Pathol*. **2005**; 207(4): 430-5.
- 112. Sheu SY, Handke S, Bröcker-Preuss M, Görges R, Frey UH, Ensinger C, Ofner D, Farid NR, Siffert W, Schmid KW.** The C allele of the GNB3 C825T polymorphism of the G protein beta3-subunit is associated with an increased risk for the development of oncocytic thyroid tumours. *J Pathol*. **2007**; 211(1): 60-6.
- 113. Erişim:** <http://www.sciencedaily.com/releases/2007/06/070604124058.htm> Gender impacts colorectal cancer progression. **Erişim Tarihi:** 22.06.2007
- 114. Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, Harriman GR, Srinivasan Y, Brabet P, Boulay G, Bradley A, Birnbaumer L.** Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice. *Nat Genet*. **1995**; 10(2): 143-50.
- 115. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG.** New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst*. **2000**; 92(3): 205-16.
- 116. Remission Erişim:** <http://www.t.rgan.com/remission.htm> **Erişim Tarihi:** 20.06.2007
- 117. Clar H, Langsenlehner U, Krippel P, Renner W, Leithner A, Gruber G, Hofmann G, Yazdani-Biuki B, Langsenlehner T, Windhager R.** A polymorphism in the G protein beta3-subunit gene is associated with bone metastasis risk in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. **2007** Nov 4 (baskıda).

- 118. Nüchel H, Frey U, Aralh N, Dürig J, Dührsen U, Siffert W.** The CC genotype of the C825T polymorphism of the G protein beta3 gene (GNB3) is associated with a high relapse rate in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*. **2003**; 44(10): 1739-43.
- 119. Schwartz MA, Baron V.** Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections. *Curr Opin Cell Biol*. **1999**; 11(2): 197-202.
- 120. Singh S, Sadanandam A, Singh RK.** Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. **2007**; 26(3-4): 453-67.
- 121. Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E.** The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res*. **2003**; 63(13): 3833-9.
- 122. Jordan NJ, Kolios G, Abbot SE, Sinai MA, Thompson DA, Petraki K, Westwick J.** Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. *J Clin Invest*. **1999**; 104(8): 1061-9.
- 123. Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M.** Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res*. **2000**; 6(9): 3530-5.
- 124. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A.** Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. **2001**; 410(6824): 50-6.
- 125. Balkwill F.** Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. **2004**; 4(7): 540-50.
- 126. Eccles SA.** Targeting key steps in metastatic tumour progression. *Curr Opin Genet Dev*. **2005**; 15(1): 77-86.
- 127. Neptune ER, Bourne HR.** Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997**; 94(26): 14489-94.
- 128. Faivre S, Régnault K, Bruyneel E, Nguyen QD, Mareel M, Emami S, Gespach C.** Suppression of cellular invasion by activated G-protein subunits Galphao, Galphai1, Galphai2, and Galphai3 and sequestration of Gbetagamma. *Mol Pharmacol*. **2001**; 60(2): 363-72.
- 129. Neptune ER, Iiri T, Bourne HR.** Galphai is not required for chemotaxis mediated by Gi-coupled receptors. *J Biol Chem*. **1999**; 274(5): 2824-8.
- 130. Bolt MJ, Mailloux RJ, Rasenick MM, Wali RK, Skarosi S, Bissonnette M, Brasitus TA, Sitrin MD.** Expression of G protein alpha subunits in normal rat colon and in azoxymethane-induced colonic neoplasms. *Gastroenterology*. **1998**; 115(6): 1494-503.
- 131. Farfel Z, Bourne HR, Iiri T.** The expanding spectrum of G protein diseases. *N Engl J Med*. **1999**; 340(13): 1012-20.
- 132. Rickert P, Weiner OD, Wang F, Bourne HR, Servant G.** Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products. *Trends Cell Biol*. **2000**; 10(11): 466-73.
- 133. Van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, Lefkowitz RJ.** Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*. **1996**; 17(6): 698-714.
- 134. Meric-Bernstam F, Pollack RE.** Oncology. In: Brunnicardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Pollock RE Eds. *Schwartz's Principles of surgery*. 8th Ed. USA: The McGraw-Hill Companies, **2005**: 249-294.

- 135. Gutkind JS. 2000. Erişim:** www.stke.org/cgi/content/full/ocsigtrans;2000/40/rel **Erişim Tarihi:** 13.09.2007
- 136. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME.** Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* **1999;** 13(22): 2905-27.
- 137. Greenhough A, Patsos HA, Williams AC, Paraskeva C.** The cannabinoid delta(9)-tetrahydrocannabinol inhibits RAS-MAPK and PI3K-AKT survival signalling and induces BAD-mediated apoptosis in colorectal cancer cells. *Int J Cancer.* **2007;**121(10):2172-80.
- 138. Saglam O, Garrett CR, Boulware D, Sayegh Z, Shibata D, Malafa M, Yeatman T, Cheng JQ, Sebtı S, Coppola D.** Activation of the serine/threonine protein kinase AKT during the progression of colorectal neoplasia. *Clin Colorectal Cancer.* **2007;** 6(9): 652-6.
- 139. Erişim:**http://www.emdbiosciences.com/html/cbc/akt_pkb_protein_kinase_b_pathway_kit_assay_antibody_inhibitor_enzyme_substrate.htm **Erişim Tarihi:** 15.07.2007
- 140. Lurje G, Zhang W, Lenz HJ.** Molecular prognostic markers in locally advanced colon cancer. *Clin Colorectal Cancer.* **2007;** 6(10): 683-90.
- 141. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y.** Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol.* **2006;** 41(3): 185-92.

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Araştırmamızda gastrointestinal kanserli (özofagus, mide, kolon, rektum ve pankreas) hastalarda, kanser hastalığı ile ilişkisi olabileceği düşünülen bir genetik mutasyon araştırılacaktır. Hastalardan ve sağlıklı bireylerden alınacak kan örneklerinde genetik çalışma yapılarak, kanserle ilişkili bir genetik farklılık olup olmadığı incelenecektir. Çalışma sonrasında hastalıkla bağlantılı olabilecek bir mutasyonun varlığı tesbit edilirse, bu sonuçlar, hastalığa yakalanma riski bulunan kişilerin önceden belirlenebilmesi veya hastalığa yakalanan kişilerin takip ve tedavileri için kullanılabilir.

Araştırmaya yaklaşık olarak 200 gastrointestinal kanserli hasta ve 200 sağlıklı bireyin katılması planlanmıştır. Çalışmamız sırasında bireylere, araştırma ile ilgili olarak herhangi bir ilaç verilmeyecek, herhangi bir tıbbi müdahalede bulunulmayacak, sadece alınan kan örneğinde çalışma yapılacaktır.

Araştırmaya sadece gönüllü olanlar katılacaktır. Gönüllüler araştırmanın herhangi bir aşamasında araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olacaktır. Ayrıca gerektiği takdirde araştırmacı, gönüllüyü rızası olsa bile çalışma dışı bırakabilecektir.

Yukarıda yer alan ve araştırmaya katılmadan önce gönüllülere verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum. Konu ile ilgili olarak bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı Soyadı:

İmzası:

Adresi:

Telefon No:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin

Adı Soyadı:

İmzası:

Adresi:

Telefon No:

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı Soyadı:

İmzası:

Şahit

Adı Soyadı:

İmzası:

ÖZGEÇMİŞ

(Dr. Özlen TUBAY BAĞDATOĞLU)

23.11.1969 yılında Ankara'da doğmuştur. İlköğrenimini Ankara Sarar İlkokulunda, ortaokul ve lise öğrenimini Ankara Atatürk Anadolu Lisesinde tamamlamıştır. Daha sonra Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesine girerek 1994 yılında mezun olmuştur. Mezuniyetinin ardından pratisyen hekim olarak T.C. Sağlık Bakanlığına bağlı Ankara ili Bala merkez sağlık ocağı, Mamak Bostancık sağlık ocağı ve Çayyolu sağlık ocağında, İçel ili Mersin Adnan Özçelik sağlık ocağında görev yapmıştır. 2002 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimini tamamlamıştır ve aynı bölümde doktora eğitimine başlamıştır. Halen bu bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir. Evli ve bir çocuk annesidir.