

**T.C.
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı**

**MİDE TÜMÖRLÜ HASTALARDA KU70 GEN
POLİMORFİZMİ ARAŞTIRILMASI**

SEZİN CANBEK

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2013

T.C.
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı

**MİDE TÜMÖRLÜ HASTALARDA KU70 GEN
POLİMORFİZMİ ARAŞTIRILMASI**

SEZİN CANBEK

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. ELÇİN BORA

Bu araştırma DEU Araştırma Fon Saymanlığı tarafından
Proje No: 2012254 ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Hekimlik mesleğimi Tıbbi Genetik uzmanı olarak sürdürmemi sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik AD'da görevli tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Tez danışmanım, tezimin her aşamasında en büyük desteğim, bana sonsuz anlayış gösteren Yrd. Doç. Dr. Elçin Bora'ya, çalışmamı yapmam için uygun laboratuvar koşullarını sağlayan Prof. Dr. Ayfer Ülgenalp'e ve ayrıca bölümümüzün başkanı Prof. Dr. M. Derya Erçal'a teşekkür ederim.

Tezimle ilgili her konuda desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Özlem Giray Bozkaya ve Yard. Doç. Dr. Tufan Çankaya'ya teşekkür ederim.

Hastalarımızın belirlenmesinde en önemli rolü oynayan Genel Cerrahi AD. Öğretim üyeleri Prof. Dr. Seymen Bora ve Doç. Dr. Koray Atilla'ya teşekkür ederim.

İstatistik analizlerde danışmanlık yapan DEÜ Halk Sağlığı AD'da görevli Dr. Duygu Aktaş ve Dr. Ceyda Şahan Akduman'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışanları ve arkadaşlarım Gülefer Aslanderen, Ayşe Tımarlı, Orkide Eylener, Naime Özsayın Koca, Kamber Başar, Erkan Kaytankaş, Semiha Korana Çetin'e her zaman sevgi dolu ve kibar tavırlarından dolayı teşekkür ederim.

Tezimin yazım aşamasında her zaman bana kapıları açık olan hastanemiz Biyokimya Bölümü asistan hekimlerine, Dokuz Eylül Fotokopi çalışanlarına teşekkür ederim.

Değerli kardeşlerim ve kardeş gibi sevdiğim arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Herşeyin ötesinde, beni ben yapan başımın tacı herşeyim annem ve babama teşekkür ederim.

Bilgelik ve bilimin elele olacağı zamanlara ve tüm varlığa sonsuz şükranla...

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
RESİM LİSTESİ	v
KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mide Kanseri	3
2.1.1. Mide Anatomisi ve Histolojisi	3
2.1.2. Mide Embriyolojisi	3
2.1.3. Mide Kanseri ve Epidemiyoloji	4
2.1.4. Mide Kanserinde Sınıflandırma	5
2.1.5. Mide Kanserinde Etiyoloji ve Patogenez	6
2.2. Kanser Gelişimi ve Genetik.....	7
2.2.1. DNA Hasarı	8
2.2.2. DNA Onarımı.....	9
2.2.3. DNA Çift İplik Kırılmaları ve Ku70 Geni	13
2.2.4. Homolog Olmayan Uç Birleştirme ve Ku70 Geni	14
2.2.5. Mide Kanseri ve Genetik.....	22
2.2.6. Ku Proteini	22
2.2.7. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	29
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
3.3. Periferik Kandan DNA İzolasyonu.....	30
3.4. Ku70 Polimorfizmlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi İle Çoğaltılması	32
3.4.1. Ku70 Promotor Bölgelerinin Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri	32
3.4.2. PCR Koşulları	33
4. BULGULAR VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	34

5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
7. ÖZET	48
8. ABSTRACT.....	49
9. KAYNAKLAR.....	50
10. EKLER	61
10.1. Ek 1. Gönüllü Olur Formu	61

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışma protokolü	32
Tablo 2. PCR basamakları	33
Tablo 3. rs2267437 polimorfizmi GG olanlar- Ki-Kare Tablosu	38
Tablo 4. rs2267437 polimorfizmi GC olanlar- Ki-Kare Tablosu	38
Tablo 5. rs2267437 polimorfizmi CC olanlar- Ki-Kare Tablosu	39
Tablo 6. rs132774 polimorfizmi GG olanlar- Ki-Kare Tablosu	39
Tablo 7. rs132774 polimorfizmi GC olanlar- Ki-Kare Tablosu	39
Tablo 8. rs132774 polimorfizmi CC olanlar- Ki-Kare Tablosu	40
Tablo 9. Olgular ve Kontrol Grubu ve Cinsiyetleri	40
Tablo 10. Yaş gruplarına göre olguların dağılımı	40
Tablo 11. Tüm genotiplerin olgularda görülme oranları	41
Tablo 12. Olguların genotip oranları	42
Tablo 13. Kontrol grubunun genotip oranları	42

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. DNA hasarı sonrası DNA onarım basamakları	10
Şekil 2. Homolog rekombinasyon ve NHEJ	15
Şekil 3. DNA çift zincir kırıklarında NHEJ onarım basamakları	17
Şekil 4. Rekombinasyon basamakları	18
Şekil 5. DNA uç kırık tamirinde sinapsis basamağı	23
Şekil 6. Homolog olmayan uç birleştirmede görevli Ku70/80 ve DNA- PKcs	24
Şekil 7. XRCC6 geni ideogramı.....	25
Şekil 8. Tümör gelişiminde Ku70 geni	26
Şekil 9. Allelik Ayrımlama Sonuç Görüntüsü	35
Şekil 10. Ku70 CC Genotipi	36
Şekil 11. Ku70 GC Genotipi.....	36
Şekil 12. Ku70 GG Genotipi	37

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Ku heterodimer yapısı	25
---	----

KISALTMALAR

ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
BAX	: Bcl-2 ilişkili X protein
Bcl-2	: B-cell lymphoma gene – Bcl-2 lenfoma geni
BRCA	: Breast Cancer Gene – Meme Kanseri Geni
cDNA	: Komplementer DNA- Tamamlayıcı DNA
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNA-PK	: DNA Protein Kinaz
DNA-PKcs	: DNA Protein Kinaz Katalitik subunit-alt ünite
DSBs	: Double Strand Breaks – Çift Zincir Kırıkları
DSBR	: Double Strand Break Repair – Çift Zincir Kırıkları Tamiri
dNTP	: Deoksiribonükleotit trifosfat
dTTP	: Deoksitimidin trifosfat
dUTP	: Deoksiuridin trifosfat
ERCC1	: Excision Repair Cross-Complementation Group 1
G0	: Stabil evre
G1	: Sentez öncesi hücre bölünmesi evresi
G2	: Premitotik faz-Mitoz öncesi dönem
HR	: Homolog recombination – Homolog Rekombinasyon
HRR	: Homolog rekombinasyon repair- Homolog rekombinasyon onarımı
LOH	: Loss of heterozygosity- Heterozigosite kaybı
NHEJ	: Non-Homolog End Joining – Homolog olmayan uçların birleşimi
NLS	: Nükleer Lokalizasyon Sinyali
NBS1	: Nijmegen Breakage Syndrome1
MM	: Multiple Myeloma
MRE11	: Meiotic Recombination 11-Mayotik Rekombinasyon 11
MRN	: Mre11, Rad50 ve Nbs1'den oluşan kompleks

- P53** : Tümör supressör protein 53
- PNKP** : Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase-Bifonksiyonel Polinükleotid Fosfataz/ Kinaz
- Q-RT PCR** : Quantitative real time polymerase chain reaction- Kuantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- RAD** : Ras-Associated with Diabets- Diyabetle ilgili Ras
- RPA** : Replication Protein A- Replikasyon Protein A
- S** : Sentez evresi
- SP1** : Specifity Protein 1
- SSB** : Single Strand Binding- Tek Zincir Bağlayıcı
- SS DNA** : Single Stranded DNA- Tek zincirli DNA
- SNP** : Single Nucleotide polymorphism- Tekli nükleotid polimorfizmi
- SYBR** : Asimetrik siyanin boya
- UNG** : Urasil-N-glikozilaz
- XPC** : Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C
- XRCC** : X-ray Repair Cross Complement
- V(D)J** : Variable Diverse Joining gen segmenti- Değişken Farklı Bağlanan Gen Bölgesi

1. GİRİŞ

Mide kanseri, her yıl 900.000 civarında bireyi etkileyen, dünyada dördüncü sıklıkta görülen bir kanser türüdür (1). Mide kanseri patogenezinde her ne kadar Helikobakter pilori bakteriyel etkisi söz konusuysa da etiyoloji tam olarak aydınlatılamamıştır (2, 3).

Mide kanseri multifaktöriyel bir hastalıktır. Çevresel faktörler genetik yatkınlıkla birlikte kanser gelişimini hızlandırmaktadır. Kanser genetiğinde ise en önemli konulardan biri DNA tamiri ve DNA tamirinden sorumlu genlerdir. İnsan DNA tamir mekanizmaları, genomu pek çok iç ve dış etkiden koruyucu özelliğindedir. DNA onarımı, hücre ölümünü, mutasyonu, replikasyon hatalarını, DNA hasarının devamlılığını ve genomik kararsızlığı azaltan bütün işlemlerde kullanılır. Bu işlemlerdeki bir anormallik kansere ve yaşlanmaya yol açmaktadır. DNA tamir sisteminde ortaya çıkan mutasyon ve defektlerin tümör gelişiminden sorumlu olduğu bilinmektedir (4, 5). Gastrik kanser patogenezinde de DNA tamir mekanizmalarındaki genetik varyasyonların önemi son yıllardaki çalışmalar ile ortaya çıkmaktadır (6).

DNA'da meydana gelen kırıklar DNA tamir mekanizmaları ile giderilmektedir (7). Bu mekanizma; homolog rekombinasyon ve homolog olmayan uç-birleştirme olarak iki yol ile gerçekleşir. Homolog rekombinasyon, benzer veya aynı dizilere sahip DNA iplikleri arasında nükleotit dizilerinin birbiriyle yer değiştirdiği bir genetik rekombinasyon tipidir(8). Homolog olmayan uç birleştirme basamağı, Ligaz-IV ve bununla bağlantılı bir protein olan XRCC4 ve DNA bağımlı protein kinaz kompleksinin Ku70, Ku80 ve katalitik altbirimi olan üç bileşenin etkisiyle meydana gelmektedir (9, 10).

DNA tamir genlerindeki genetik varyasyonlar gastrik kanser etiyolojisine katkıda bulunmaktadır. Bununla beraber, gastrik kanser ve DNA tamir gen polimorfizmlerine yönelik yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ancak, deri, meme, mesane ve oral kanserlere yönelik DNA tamir kapasitesi ve kanser predispozisyonu ilintili çalışmalar yapılmıştır (6, 7, 9, 11-17) .

Literatürde Ku70 gen polimorfizmi ve mide kanseri ile ilgili Taiwan'da yapılmış bir çalışmada dört adet polimorfizm çalışılmış; bu polimorfizmlerden Ku70 geni T-991C promotörünün mide kanseri ile bağlantılı olduğu saptanmıştır (6).

1.2. AMAÇ

Bu tezin amacı; mide kanserine yatkınlığı öngörmek amacı ile mide kanserli vakalar ve sağlıklı kontrol grubunda Ku70 gen polimorfizmlerinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MİDE KANSERİ

2.1.1. MİDE ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Mide, diafragma'nın altında, karın boşluğunun üst bölümünde yer alan, sindirim kanalının en geniş bölümüdür. Ağızda başlayan karbohidrat sindirimini devam ettirme fonksiyonunun yanısıra, hidrojen klorür (HCl) ve bunun etkisi ile proteolitik pepsine dönüşen pepsinojen salgılayarak protein sindirim işlemini başlatmakla görevlidir.

Anatomik olarak mide; Kardial, fundus, korpus, antrum ve pilor olmak üzere beş bölüme ayrılmaktadır.

Gastrik mukoza; Kardiyak, fundik (korpus) ve pilorik (antral) olmak üzere üç ana bölgeden oluşur. Bu bölgeler içten dışa doğru tunica mukoza, tunika submukoza, tunica muscularis ve tunica serosa olmak üzere dört tabakadan meydana gelir.

Bu tabakalardan; Tunica mukoza, kalın ve yumuşak yüzeyle bir tabaka olup midenin iç yüzünü örter; Tunika submukoza, temelde gevşek bağdokusu karakterindedir; Tunika muskularis, düz kas lifleri içerir; Tunica serosa, mideyi örten periton tabakasıdır.

Mide yüzeyini, mukus salgılayan basit tek katlı prizmatik tipte epitel hücreler oluşturur. Salgılanan mukus, epitel yüzey üzerinde kalın bir tabaka oluşturarak hücreleri mide asidinin ve pepsinin zararlı etkisinden korur.

Gastrik kanserler diğer organların malign tümörlerinde olduğu gibi bu anatomik yapılar ve histolojik özellikler göz önüne alınarak sınıflandırılmaktadır (18).

2.1.2. MİDENİN EMBRİYOLOJİSİ

Embriyonun embriyonik foregut'u yaşamın birinci ayında tamamen faringiyaldir. Sonra kaudal kısmın uzaması ile gelecekteki özofagus ve hemen onun bitişiğinde mide oluşur. Beşinci haftada embriyo 4-5 mm boyunda iken, gelecekteki mide bölgesinde genişleme meydana

gelir. Genişlemiş boru şeklindeki mide, ön ve arka mezenterler tarafından yerinde asılı tutulur. Altıncı ve yedinci haftalarda arka mezenterik kenarın ön mezenterik kenara göre daha hızlı büyümesi, midenin dönmesine ve yatay konuma geçmesine yol açar. Böylece; arka mezenterik kenar sola ve aşağı ilerleyerek büyük kurvaturu, ön mezenterik kenar yukarı ve sağa dönerek küçük kurvaturu oluşturur. Buna bağlı olarak özofagusun sol ve sağ yanında seyreden nervus vaguslar yer değiştirerek sol vagus öne, sağ vagus arkaya geçer. Ön mezenter küçük omentumu, arka mezenter de büyük omentumu meydana getirir (19).

2.1.3. MİDE KANSERİ VE EPİDEMİYOLOJİ

Mide kanseri (MK), insidansının giderek düşüş göstermesine rağmen halen dünyada kansere bağlı ölümlerde, akciğer kanserlerinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (20-22).

Hastalığın coğrafi dağılımı farklılık göstermekle birlikte Japonya, Kore ve Çin'deki sıklığı diğer bölgelere göre daha yüksektir (23-25).

Ülkemizde ise 2004 yılı Sağlık Bakanlığı verilerine göre en sık gözlenen kanserler arasında MK'ler beşinci sırada yer almaktadır (26).

Mide kanserlerinin erkeklerde görülme oranının kadınlara göre, yaklaşık olarak iki kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (27-29).

Erkeklerde MK insidansının daha yüksek olmasının sebebi henüz aydınlatılmamış olmasına rağmen iki ihtimal üzerinde durulmaktadır. Bunlardan birincisi, biyolojik farklılığa bağlı olarak kadınlık hormonlarının (östrojen, vb) MK'lerde koruyucu olabileceğidir. İkincisi ise, MK'lerin oluşumu esnasında erkeklerin çevresel faktörler ile etkileşimini sonucunda daha hassas olabildikleri, özellikle *Helicobacter pylori* (HP) infeksiyonunda erkeklerin daha çok kronik gastrit olduğu ve bununda MK'lerde öncü haberci olduğu belirtilmektedir (25). Buna ilaveten Singh ve ark (1997)' nin yaptıkları çalışmada ise normal gastrik mukozada östrojen reseptör miktarının, MK mukozasından daha fazla olduğunu ve östrojenin MK oluşumunda koruyucu bir faktör olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Genel olarak sosyoekonomik düzeyi düşük pek çok popülasyonda sıklıkla rastlanan. MK'lerin artan yaşla birlikte insidansı da artmakta ve beş ile yedinci dekatlar arasında en yüksek seviyelere ulaşmaktadır (30, 31).

2.1.4. MİDE KANSERİNDE SINIFLANDIRMA

Mide kanserleri en sık olarak prepilorik bölge, antrum ve küçük kurvatur yerleşimlidir (32). Sınıflandırılmaları tümör kitlesinde değişik histolojik özellikler bir arada bulunabileceğinden dolayı güçtür (33). Mide tümörlerinin yaklaşık %90-95'i adenokarsinom tipindedir. Kalan kısmın çoğunluğunu ise Non-Hodgkin lenfomalar ve GIST (Gastrointestinal stromal tümörler) oluşturur (34, 35).

Lauren (1965) tarafından yapılan sınıflandırmada gastrik adenokarsinomlar tümörlerin histolojik yapılarına göre intestinal ve diffüz olmak üzere iki histolojik tipe ayrılmıştır. İntestinal tip erkeklerde ve ileri yaşlarda daha sık gözlenirken, diffüz tip ise daha genç bireylerde ve her iki cinsiyette eşit oranda görülür (36, 37).

Lauren sınıflaması epidemiyolojik ve patogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak tümörün hem histolojik hemde büyüme paterni göz önüne alınarak yapılan bu sınıflamada mide kanserlerinin önemli bir bölümü sınıflandırılmayan gruba dahil olmaktadır.

Mide kanserlerinde kullanılan birçok benzer sınıflandırma olmasına rağmen epidemiyolojik, klinik ve patolojik çalışmaların birçoğu WHO (World Health Organization) sınıflandırmasına dayanmaktadır (38) . Bu sınıflamaya göre;

1. Adenokarsinom: Papiller, tubuler, müsinöz, taşlıyüzük hücreli
2. Adenoskuamoz
3. Skuamoz
4. Küçük hücreli
5. İndiferansiye
6. Diğer karsinomlar (koryokarsinoma, embriyonik karsinoma) şeklindedir.

Mide kanserlerinin evrelemede ise en yaygın kullanılan sınıflandırma sistemi American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından yapılan TNM evreleme sistemidir (AJCC 2010). Tümör Evrelemede (T), mide duvarı içinde infiltrasyon derinliğini, iç organlara ait serozada penetrasyonu ve diğer organlara infiltrasyonu; nodal metastaz (N) bölgesel lenf nodlarının boyutu ve sayısını, uzak metastaz (M) ise uzak metastazların varlığını ya da olmadığını belirtir (39, 40).

2.1.5.MİDE KANSERLERİNİN ETİYOLOJİSİ VE PATOGENEZİ

Mide kanserlerinin gelişiminde birbirleriyle bağlantılı pek çok çevresel ve genetik risk faktörü bulunmaktadır (41). Çevresel faktörler içerisinde diyetle aşırı tuz ve tütülenmiş gıda alımı, mide pH'sının yükselmesi (hipoklorhidri), hijyenik şartların kötü olması ve vitamin C eksikliği gibi faktörler yer almaktadır (37)(42, 43). Ayrıca *Helicobacter pylori* (HP) infeksiyonu, A kan grubu ve atrofik gastrit, gastrik polip varlığı, daha önceden geçirilmiş mide rezeksiyonu da etiolojide sorumlu tutulan faktörlerdendir (44-47).

Doksanlı yıllardan itibaren, MK hücrelerindeki çeşitli genetik ve moleküler değişiklikler de mide kanserinin oluşumunda risk faktörleri arasında gösterilmeye başlanmıştır. Yapılan sitogenetik çalışmalar, MK hücrelerinde özellikle kromozom 3 (yeniden düzenlenmeleri), 6 (6q21'de delesyon), 8 (trizomi), 11 (11p13-p15 aberasyonu) ve marker kromozomları kapsayan çok sayıda sayısal ve yapısal anomaliler olduğunu göstermiştir (48, 49). Ayrıca onkogenlerin aktivasyonu hipermetilasyon (50, 51), hücre adezyonunun azalması (52), telomeraz reaktivasyonu (53-55), mikrosatellit instabilitesi varlığı (56, 57) ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunun da (58) MK hücrelerinde meydana gelen moleküler değişikliklerden olduğu belirtilmektedir (59, 60). MK'lerde risk faktörü olarak gösterilen tümör baskılayıcı genlerin temel fonksiyonları, hücre büyümesinin inhibisyonu ve diferansiyasyonudur. Tümör baskılayıcı gendeki her iki allelde normal işlevin kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine ve tümör büyümesine neden olur (61, 62) . Fonksiyonlarının bozulması sonucunda DNA'nın yapısında meydana gelen genetik ve epigenetik birtakım değişimlere; tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonların (63, 64), kromozomal heterozigosite

kayıplarının (65, 66), hipermetilasyonların (67) ve gen inaktivasyonlarının (68) neden olabileceği yönünde çalışmalar mevcuttur. Tüm bu DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap veren hücre, ağır DNA hasarları sonucu apoptoza giderek ölür. Hücre, DNA hasarlarını DNA tamir mekanizmaları ile tamir edebilir. DNA hasarı replikasyon sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa neden olur. DNA'da birçok özgün değişimi içine alan genomik kararsızlık, hem kanserin hem de yaşlanmanın önemli bir belirtisidir (69). Normal koşullarda DNA tamirinde görevli genlerden biri olan Ku70 (XRCC6) genindeki değişiklikler ile MK arasındaki ilişkiyi inceleyen çok az sayıda çalışma mevcuttur (6). Ku70 genindeki değişimlerin belirlenmesi moleküler temeli henüz aydınlatılmamış olan gastrik karsinogenezin anlaşılmasında yararlı olacaktır.

2.2. KANSER GELİŞİMİ VE GENETİK

Kanser konusundaki genetik ve epigenetik çalışmalar esas olarak kanser gelişim mekanizmaları üzerine olmuştur. Bununla birlikte, son zamanlarda genetik ve epigenetik değişikliklerin genom çapında analizine yönelik güçlü teknolojilerin çıkmasıyla, belirli kanserlerdeki genetik ya da epigenetik yanı sıra gen ifadesindeki çoklu değişiklikleri belirleme becerisi ilerlemektedir. Bu gelişim, her bir kansere özgü genetik ve epigenetik değişimlerin ilişkisini haritalandırmak için bir olanak sağlamaktadır. Böylece, hastaların belirli bir kansere özgü moleküler özellikleri dikkate alan protokollere göre tedavi edileceği ve izleneceği bir kişiselleştirilmiş tıp biçimine doğru giden ilk adım oluşmaktadır. Ancak, böyle bir kişiselleştirilmiş tıbbı gidecek yol çok uzundur. Genetik ve epigenetik değişiklik testlerinin hastanelerde rutin ve maliyeti karşılanabilir pratiğin bir parçası haline gelmesi gerekir. Ayrıca, genetik ve epigenetik değişikliklerin örüntüsüne göre hangi tedavi protokolünün en iyi sonuçları vereceğini gösterecek klinik denemelerin yapılması da gerekecektir. Yakın gelecek hangi değişik kombinasyonların kanser risk faktörlerine maruziyetin ve tümör genozinin güvenilir biyomarkerları olarak yorumlanabileceği konusunda öngörüler getirecektir. Bu sayede, kanserden korunmada çevresel faktörlerin daha iyi

anlaşılabilmesi ve kanser tedavisinde geliştirilecek yeni ilaçların seçiminde önceliklerin belirlenmesini sağlayacaktır (70-72).

2.2.1. DNA HASARI

DNA lezyonları oluşturabilen bazı ajanlar ya da olgular vardır . Bu etkenler DNA bazlarında modifikasyonlara, tamamlayıcı iplikler arasında kovalent bağ oluşumuna, tek iplik kırılmalarına (SSB'ler) ve çift iplik kırılmalarına (DSB'ler) neden olurlar. Bu hasarlar, gıda, su, kimyasal ürünler, radyasyon ve benzerleri gibi etkenlerden kaynaklanabilir (73).

Alkil fonksiyonlarına sahip bazı elektrofil moleküller, purin ve pirimidin bazlarının azot moleküllerine karşı yüksek afiniteye sahiptir. Bunun sonucu olan alkilleme noktasal mutasyonlara yol açabilir, aynı zamanda da bitişik nükleotidler arasındaki bağlantıyı da kararsız hale getirerek SSB'ler ve DSB'ler oluşturur. Örneğin, sigara dumanında da bazı alkilleyici ajanlar bulunur, bu durum sigaranın kanserojenik özelliklerini kısmen açıklamaktadır (74).

Farklı radyasyon türleri de DNA hasarı oluşturabilir. Örneğin, güneşten gelen morötesi (UV) ışınımı DNA'daki iki bitişik pirimidin bazı arasında kovalent bir bağ yaparak, timin dimerleri oluşturur. İyonlaştırıcı radyasyon da dolaylı ya da dolaysız olarak DNA hasarı yaratabilir; ya DNA zincirindeki şekerlerde radikal oluşumuna neden olarak doğrudan hasara, ya da su moleküllerinin radyolizini artırıp, nükleotitleri bağlayan fosfodiester bağlarını etkileyen radikal iyonları oluşturarak dolaylı hasara yol açar. İki radikal oluşturduğu iki hasar bölgesi arasındaki mesafe kısaysa, DNA zinciri kırılabilir; bu durum, gama ışınımının neden olduğu en sık kırılma biçiminin DSB'ler olmasının nedenidir (8).

Genomik DNA, normal hücresel koşullar altında bile kendiliğinden oluşan endojen değişikliklere maruz kalır . DNA hasarına yol açan kimyasal olaylar arasında hidroliz, yükseltgenme ve elektrofilik saldırı sayılabilir (8).

Bu tepkimeler hücrelerin ekzojen kimyasallara (örneğin çevresel ajanlar, gıda bileşenleri) maruz kalmasıyla tetiklenir, ama endojen metabolik süreçlerden de kaynaklanabilir.

Kendiliğinden oluşarak hücrelerde DNA hasarına yol açan kimyasal tepkimeler arasında en sık görüleni purinsizleştirme ve aminsizleştirmedir. Isıl dalgalanmaların neden olduğu purinsizleştirme, deoksiribozdaki pürin bazlarındaki N-glikozil bağlarının hidrolizini temsil eder. Bir insan hücresinden her gün purinsizleştirme yoluyla 5000 kadar pürin bazı (adenin ve guanin) yok olur. Aminsizleştirme, günde hücre başına 100 baz hızıyla sitozini urasil ya da timine dönüştürür. Ayrıca, uzun süredir memeli genomlarında mutasyonun ana nedeninin metillenmiş CpG dizilimleri olduğu düşünülmektedir. CpG bölgelerinin nedenleri konusu çok dikkat çekmiştir; CpG bölgeleri bir dizi genetik hastalıkta ve bir çok kanserde saptanmış, ortak mutasyon ya da DNA metillenme bölgeleridir. Tüm varsayımlar ve hipotezler sitozin kalıntılarının metillenmesinin önemi konusunda aynı görüştedir; metillenme hidrolitik aminsizleştirmenin hızını ve komşu guaninlerin elektrofillerle tepkimesini arttırmaktadır (8).

DNA hasarına yol açan endojen kimyasal olayların başka örnekleri olarak kendiliğinden hidroliz, alkilleme nedenli hidroliz ya da glikosilat katalizli baz kesme onarımının oluşturduğuapurinik/pirimidinik (AP) bölgeler verilebilir. DNA'ya oksijen radikali saldırısı yükseltgenmiş bazların çok fazla olmasına ve ipliğin kırılmasına yol açabilir. Kromozomal değişimlerse, başka etkenlerin yanı sıra, DNA iskeletinin yükseltgenmeli kırılmasının ya da kromatinin yeniden modellenmesi sırasında enzimatik kırılmanın (örneğin topoizomeraz II ile) neden olduğu çift sarmallı kırılmalarla ortaya çıkar. DNA kopyalanmasının kendisi de durdurulan ya da bloke edilen kopyalama çatalları biçiminde, hücre çevrimi başına on kadar çift sarmal kırılması yaratır (8).

2.2.2. DNA ONARIMI

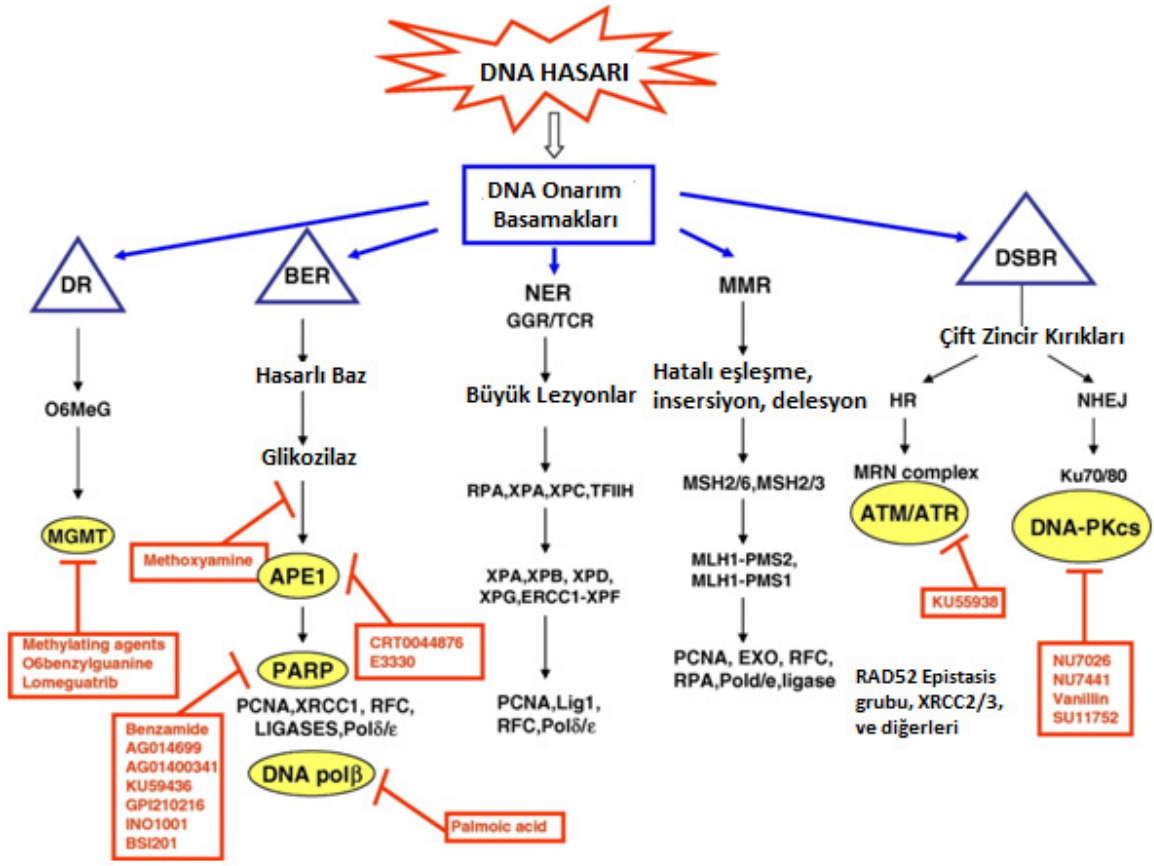
DNA onarım genleri iki alt gruba ayrılabilir:

- a) DNA onarımında sinyal iletimi ve onarımın düzenlenmesi ile ilgili genler
- b) Hatalı eşleşme onarımı, baz ve nükleotid çıkarma onarımı ile ilgili genler

Her bir insan hücresi içindeki genomik DNA sürekli olarak hem güneş ışığı ve tütün gibi çevresel kökenli, hem de su ve oksijen dahil endojen kökenli bir dizi hasar verici ajana maruz

kalır. Bu durum, hasar gören nükleotidlerin kopyalanma sırasında, DNA ipliğinde yer alarak mutasyona neden olmalarından önce, uzaklaştırılmaları ve yerlerine yenilerinin konması için sürekli bir denetim gerektirir.

DNA onarımı pek çok farklı şekilde yapılmaktadır ve sorumlu genler de onarım mekanizmalarındaki yerlerine göre gruplandırılmaktadır. Bu genlerin yer aldığı onarım mekanizmaları başlıca beş grupta incelenebilir (Şekil 1) (75).



Şekil 1. DNA hasarı sonrası DNA onarım basamakları (75)

1. Direkt onarım ya da hasarın geri döndürülmesi

Üçe ayrılır:

a) Fotoreaktivasyon: Ultraviyole ile oluşan pirimidin dimerlerine spesifiktir. Sadece pirimidin dimerlerini kırdıklarından hata olasılığı yoktur.

b) O-6-metilguanin onarımı: O-6-metilguanin, alkilleyici ajanlar varlığında oluşur ve yüksek oranda mutajeniktir. O-6-metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA'daki yanlış metillenen bazların CH₃ gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek normal guanin oluşumunu sağlar.

c) Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu: Bir zincirde meydana gelen basit kırıklar DNA ligaz enzimi ile hemen onarılmaktadır. Enzim, enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5' fosfat grubu ile 3'OH grubu arasındaki fosfodiester bağı oluşturarak onarımı gerçekleştirir.

2. Eksizyon (kesip-çıkarma) onarımı

Bu onarım tüm prokaryot ve ökaryot organizmalarda bulunan en önemli onarım sistemi olup üç temel basamak içerir. Eksizyon onarım mekanizmasında, DNA'daki hasarlı bazın oligonükleotid parçaları çıkartılıp bu bölgenin doğru bazlarla doldurulması ve oluşan çentiğin ligasyonla kapatılması ana prensiptir.

a) Baz eksizyon onarımı (BER) (base excision repair): Yanlış yerleştirilen ve hasarlı bazları uzaklaştırmak için kullanılan onarım mekanizmasıdır.

b) Nükleotid eksizyon onarımı (NER) (nucleotide excision repair): DNA bazları üzerinde büyük eklentiler oluşturan bir çok farklı hasarı tanıyabilen bir onarım mekanizmasıdır.

c) Mismatch (yanlış eşleşme) eksizyon onarımı (MER): DNA replikasyonu esnasında meydana gelen ve çift sarmalda anormal boyutlara neden olan, normal bazların hatalı eşleşmesi şeklindeki hataları düzeltir.

3. Rekombinasyonel onarım

DNA'ların zarar görmüş parçasının değiştirilmesinde kalıp olarak kullanılacak tamamlayıcı ipliğin bulunmadığı durumda kullanılan, ve replikasyondan sonra aktif olan bir onarım mekanizmasıdır.

4. SOS onarımı

DNA hasarının yüksek oranda olduğu ve diğer onarım mekanizmalarının başarılı olamadığı durumlarda devreye giren acil cevap sistemidir.

5. DNA çift zincir kırıklarının onarımı

a) Serbest uçların homolog olmayan bağlanması (NHEJ): Kısaca bu işleyiş homolog bir kromozomdan faydalanmaksızın DNA uçlarının bağlanmasının biyokimyasal bir yoludur.

b) Homolog rekombinasyon (HR): Bu yolda DNA çift zincir kırıkları, genetik bilgi korunarak, homolog DNA ile rekombinasyon aracılığıyla onarılır.

İnsan hücrelerinde normal DNA yapısının yeniden oluşturulması, hasarlı ya da uygun olmayan bazıları keserek bunların yerine normal nükleotid dizilimini getiren birkaç DNA onarım enziminden biriyle yapılır. Bu tür hücresel yanıtta “kesme onarımı” adı verilir ve bu şekilde işleyen iki ana onarım yolu vardır: esas olarak endojen ajanların neden olduğu modifikasyonlar üzerinde çalışan “baz kesme onarımı” ve çevresel mutajenlerin neden olduğu lezyonları ortadan kaldıran “nükleotid kesme onarımı”. Ultraviyole genelde insan hücrelerinin en sık maruz kaldıkları ekzojen mutajendir ve UV ışınının neden olduğu karsinogeneze karşı korumada nükleotid kesme onarımının önemi, kalıtılan bir hastalık olan Kseroderma pigmentosum örneğinde açıkça görülür. Bu hastalığa yakalanan bireylerde nükleotid kesme onarımında görev alan enzimlerden biri eksiktir ve bu bireylerde güneş ışığına maruz kaldıktan sonra deri kanseri gelişmesi riski diğer bireylere göre bin kat daha fazladır. XP sendromunda XPA ile XPG arasında adlandırılmış yedi gen hasarlıdır (76-78).

Son yirmi yılın en büyük ilerlemelerinden biri, baz kesme onarımı ve nükleotid kesme onarımında rol alan genlerin ve bunların protein ürünlerinin izolasyonu ve niteliklerinin belirlenmesi olmuştur. Daha önce; DNA onarımında rol aldıkları düşünülen bazı proteinlerin sadece bu görevi üstlenmedikleri, aynı zamanda DNA kopyalanması ve rekombinasyonu gibi diğer hücresel süreçlerin de ayrılmaz bir parçasını oluşturdukları açıkça anlaşılmıştır (79).

Hem baz kesme onarımında hem de nükleotid kesme onarımında ilk basamak, DNA sarmalındaki özel hasar formlarını ya da bir şekil bozukluğunu saptayan enzimler aracılığıyla DNA modifikasyonunun tanınmasıdır. Hasarın tanınmasını, bir kesme basamağı izler; bu basamakta modifiye olmuş nükleotidi içeren DNA uzaklaştırılır. Boşluk doldurarak DNA sentezi ve serbest uçların bağlanmasıyla onarım süreci tamamlanır. Nükleotid kesme onarımı, DNA'nın transkripsiyondan geçmeyen (protein kodlamayan) bölümlerinde gerçekleşebilir.

DNA baz kesme onarımı, şeker-baz bağının hasara özgü bir DNA glikosilazla (örneğin hNth1 ya da urasil DNA glikosilaz) kırılması ve bir apuritik/apirimidinik nükleazla (insan AP1) kesilmesiyle tek bir bazın uzaklaştırılmasını içerir. Boşluğun doldurulması, hasar görmüş

iplikte (kullanılan yola bağlı olarak) tek bir bazın yerine başkasının geçirilmesiyle ya da birkaç bazın yeniden senteziyle gerçekleştirilir (4, 80-82).

DNA'da oluşabilecek daha karmaşık ve olağan dışı hasar biçimleri, örneğin çift iplik kırılmaları, baz hasarı kümesi bölgeleri ve normal kopyalama sistemini bloke eden, kodlayıcı olmayan lezyonlar alternatif mekanizmalarla ele alınırlar. Hastanın iyonlaştırıcı ısınıma aşırı duyarlılık ve değişmiş iplik kırılması durumları sergilediği kalıtsal insan hastalıkları, örneğin ataksia telanjiektazi ve Nijmegen kırılma sendromu, bu süreçlerde rol alan onarım enzimlerinin çalışılması için yararlı modellerdir. Bu alanda, 1990'ların son yıllarının en büyük ilerlemesi baz kesme onarımı ve nükleotid kesme onarımının incelenmesi olmuşsa, bir sonraki on yılın en büyük ilerlemesi de muhtemelen iplik kırılmasının onarımının anlaşılması olacaktır. İyonlaştırıcı radyasyonun oluşturduğu DNA hasarının onarımında rol alan enzimlerin karakterizasyonu dahil, ışıma karşı duyarlılığın olası nedenlerinin daha iyi anlaşılması, hastalar için radyoterapi dozlarının daha iyi uyarlanmasını sağlayabilir (83-85).

2.2.3. DNA ÇİFT İPLİK KIRILMALARI VE KU70 GENİ

DNA çift zincir kırıkları bir hücrenin yaşamı boyunca sürekli olarak ortaya çıkan en tehlikeli DNA lezyonu türleridir. DNA çift zincir kırıkları hem endojen hem de ekzojen unsurlardan kaynaklanabilir ve mutasyon oluşumuna, onkogenik dönüşüme ya da hücre ölümüne yol açabilecekleri için, genom için önemli bir tehlikedirler (86-88).

Hücre, DSB'lerle etkin bir şekilde uğraşmak için, DNA hasarına karşı başlatılacak çok sayıda hücresel süreç evrimleştirmiştir; bunların arasında kontrol noktası etkinleştirmesi, DNA onarımı ve gen transkripsiyonunda değişiklikler sayılabilir. Bu süreçler, her yerde bulunan endojen ve çevresel genotoksik saldırıların DNA'ya hasar veren etkilerini ortadan kaldırmaktadır (88).

DNA hasar kontrol noktası, DNA'daki hasarı saptamak ve yanıt vermek için birlikte hareket eden, etkileşimli bir yollar ağı olarak tanımlanabilir. Bu ağda rol alan proteinler; sensörler, transdüktörler ve efektörler olarak ayrılabilir. Sensör proteinler, DNA hasarını dolaylı ya da

dolaysız yollarla tanıyabilir ve bu anormalliklerin varlığına dair sinyal vererek biyokimyasal tepkimeler dizisini başlatabilirler. Transdüktörler, tipik olarak başka kinazları ya da akış aşağı hedef proteinleri fosforilleyerek, sensörlerden gelen hasar sinyalini aktaran ve çoğaltan protein kinazlardır; bu süreç de sinyal verme olarak tanımlanabilir. Efektör proteinler transdüktör protein kinazların nihai akış aşağı hedefleridir ve bunlar asıl onarım proteinleri olabilirler (88-90).

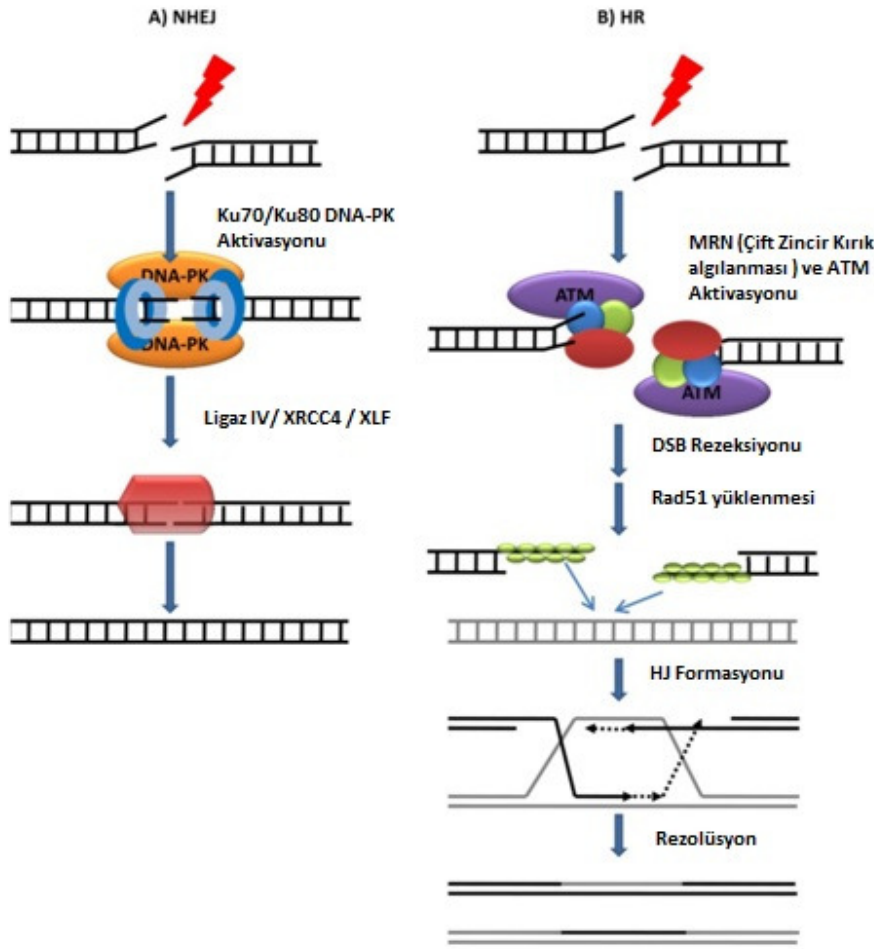
DNA çift zincir kırıklarının etkin bir biçimde onarılabilmesi için, önce DNA hasarının saptanması ve bu bilginin bir sinyal yoluyla efektörlere ve DNA onarım proteinlerine aktarılması gerekir. Ancak, tüm bu adımların içinde en az bilineni DNA kırılmalarının saptanmasıdır (91). DNA hasarı yanıtında detektör ve transdüktör olarak rol oynayan başlıca genlerden bir tanesi; ATM (Mutasyonlu Ataksia Telangiectasia) kinazlar süper ailesi ile etkinleştirilmesi, DNA hasarının saptanmasında ve hücre çevriminin durdurulmasında önemli rolü olduğu bilinen p53'tür (92). Bu önemli oyunculara ve yollardaki hasarlar kansere ve başka hastalıklara yol açar. İlk DNA sinyal verme olaylarından biri ve en kolay saptanabilen DNA hasar yanıtı, DSB bölgelerinde, H2A varyantında, serin 139'da H2AX'in fosfatidilinositol-3 kinaz benzeri kinaz ailesi (PI3K) ile fosforillenmesidir (93-95). γ H2AX'in varlığı, kırılma bölgesinde onarım proteinlerinin tutulması/toplanması için HR (Homolog Rekombinasyon) ve NHEJ (Homolog Olmayan Uç Birleştirme) onarımı gibi her iki DSB türü için gereklidir (95, 96). Hepsi de PIKK ailesinin üyeleri olan ATM, ATR (ATM ve Rad3 ilişkili protein) ve DNAPKc'ler H2AX'in fosforillenmesi için gereklidir, dolayısıyla DNA hasarının detektörleri olabilirler (96, 97). Bu detektörlerin etkinleşmesinde; DNA kırılmaları, kromatin yapısında ya da uzamsal düzenlemede bir modifikasyon oluştururlar ve bu modifikasyon ATM'nin otofosforillenmesi ve etkinleşmesi için yeterli olur (98, 99).

2.2.4. HOMOLOG OLMAYAN UÇ BİRLEŞTİRME VE KU70 GENİ

DNA'nın homolog olmayan uç birleştirme onarımında, Ku70/Ku80 heterodimeri ilk detektör olarak görünmektedir, çünkü derhal hasarlı uçlara bağlanır ve DNA-PK'ları toplar (99).

Sürekli oluşan DNA hasarı için iki ana DSB onarımı türü evrimleşmiştir, **HR ve NHEJ** :

- **HR**'da homolog bir kopya genellikle kardeş kromatidi kullanarak kayıp DNA'yı yeniden yapar. Dolayısıyla, bu tür DSB onarımı DNA kopyalanması sonrasında, iki kromatidin olduğu G2 fazında daha çok gerçekleşir. **NHEJ** ise HR'den daha az karmaşıktır fakat hatalara da açıktır. DNA uçlarını işleme tabi tutar, herhangi bir modifikasyon yapmadan uçları birbirine bağlar, dolayısıyla da sık hatalara neden olur (Şekil-2) (8, 100).



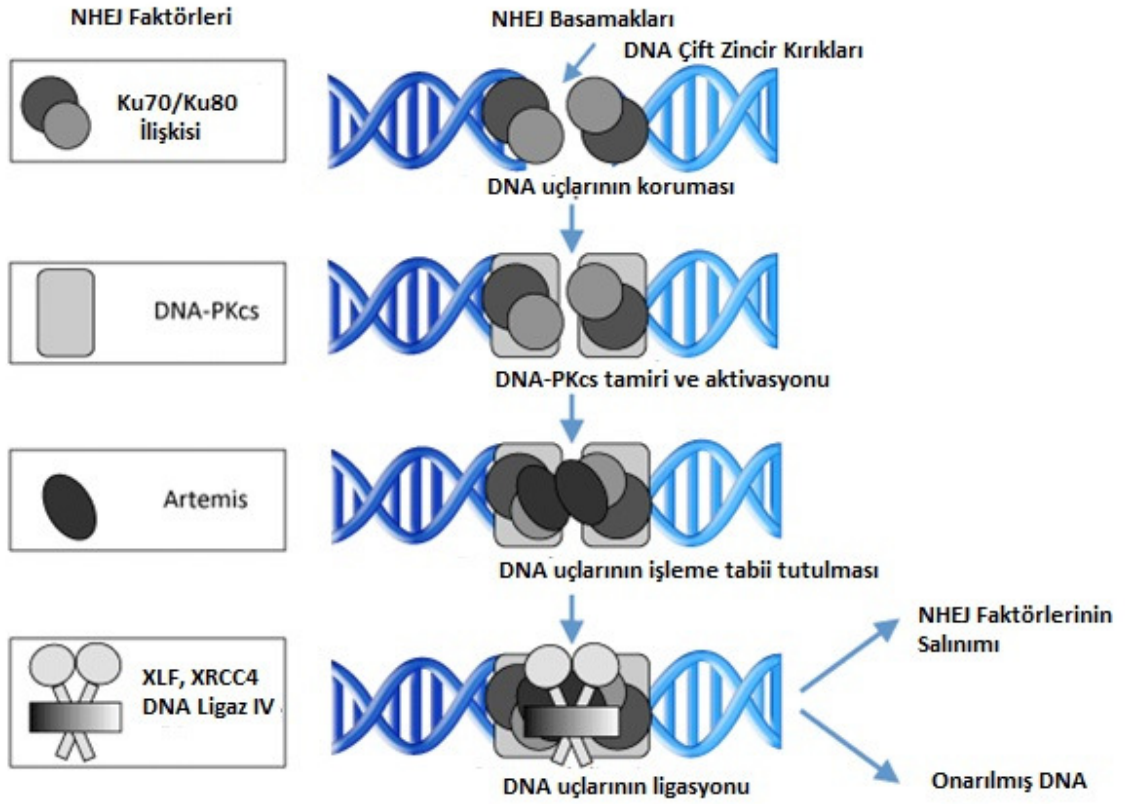
Şekil 2. Homolog rekombinasyon ve NHEJ (101)

Ayrıca, daha az kullanılan üçüncü bir DSB onarımı türü daha vardır: Hem NHEJ hem de HRR ile ortak bileşenleri olan, NHEJ'de olduğu gibi DNA uçlarını birbirine bağlamak için birkaç baz çiftinden oluşan, sınırlı bir kohezyon bölgesinin kullanıldığı tek iplikli bağlanma-eşleşme (SSA-Single Strand Annealing) onarımıdır (8, 102).

Memelilerde çoğunlukla HR kullanılır, alt ökaryotlarda ise NHEJ daha sık kullanılmaktadır. Mitotik olarak kendini kopyalayan hücrelerde NHEJ'in rolünün HR'den daha önemli olduğu düşünülmektedir. HR, mayoz sırasında ve hücre çevriminin geç S ve G2 aşamaları sırasında kardeş kromatidler ortaya çıktığında daha önemli bir rol oynar; NHEJ ise G1 ve erken S aşamalarında daha önemlidir. Basitleştirmek gerekirse, genel olarak bir mekanizmanın diğerine daha baskın olmasının hücre çevrimi aşamasına ve DSB türüne bağlı olduğu kabul edilmektedir (8) .

Homolog olmayan uç birleştirme yoluyla DNA onarımı homolog rekombinasyona kıyasla daha az karmaşık olmasına rağmen hatalara daha açıktır. Bu türden onarım, hasarlı dizilimin homolog kromozom üzerinde bozulmamış kopyasıyla eşleşmesini (ki tipik olarak çekirdek içinde uzakta bir yerdedir) ya da yaklaşmasını gerektirmez. NHEJ onarımı birkaç aşamaya bölünür; önce hasarlı uçların işleme tabi tutulmasıyla başlar, sonra iplikler arasında moleküler köprü oluşturulur, ki bu köprü bağlanmayı kolaylaştırır, son olarak da kayıp bazlar tamamlanır ve birleşme bitirilir (8). Hücresel uç birleştirme sistemlerinin tüm bu sapmaları işleme tabi tutma yetenekleri olduğuna dair çok miktarda kanıt bulunmaktadır. Bu etkinlikler Tdp1 ve APE1 benzeri uzmanlaşmış endonükleazlarla yürütülür. Bu temizleme basamağı kimyasal modifikasyonların yok edilmesi ve dolayısıyla uçların birleşmelerinin önlenmesi için çok önemlidir (8). Ku70 (70 kDa) ve Ku80'dan (86 kDa) oluşan sıkı bir kompleks olan Ku heterodimeri, önce DNA kırığına tanır ve DNA'nın ucuna bağlanma eğilimindedir. Daha sonra, Ku70/Ku80 heterodimeri DNA-PK adlı holoenzimi oluşturan DNA-PKcs'e bağlanır. Bir DNA ucunda DNA-PK holoenzim kompleksinin oluşumu kinaz etkinliğini başlatır. Bu etkinleşme, DNA'nın en ucunun lokal olarak denatüre olmasını ve tek ipliklerin birkaç bazının tanımlı kanallara geçirilerek iki DNA ipliğinin birbirine yaklaşmasını sağlar (8).

Bir sonraki basamak, DNA-PK yoluyla ligaz IV'ün kullanılmasıdır (Şekil 3). Ku ve DNAPK'nın XRCC4/ ligaz IV etkinliği üzerindeki etkisi karmaşıktır fakat uç birleştirmede varsayımsal rollere sahip nükleazlar olan bu proteinlerin hepsinin, ister tek başlarına ister birlikte, lineer DNA'lar olan WRN, Artemis ve MRE11'in uç uca birleşmesini destekler. Bunların katalitik etkinlikleri kırılma bölgesinde hasar görmüş olan bazların birleşme öncesinde işleme tabi tutulması ya da "temizlenmesi" açısından önemli olabilir (8).

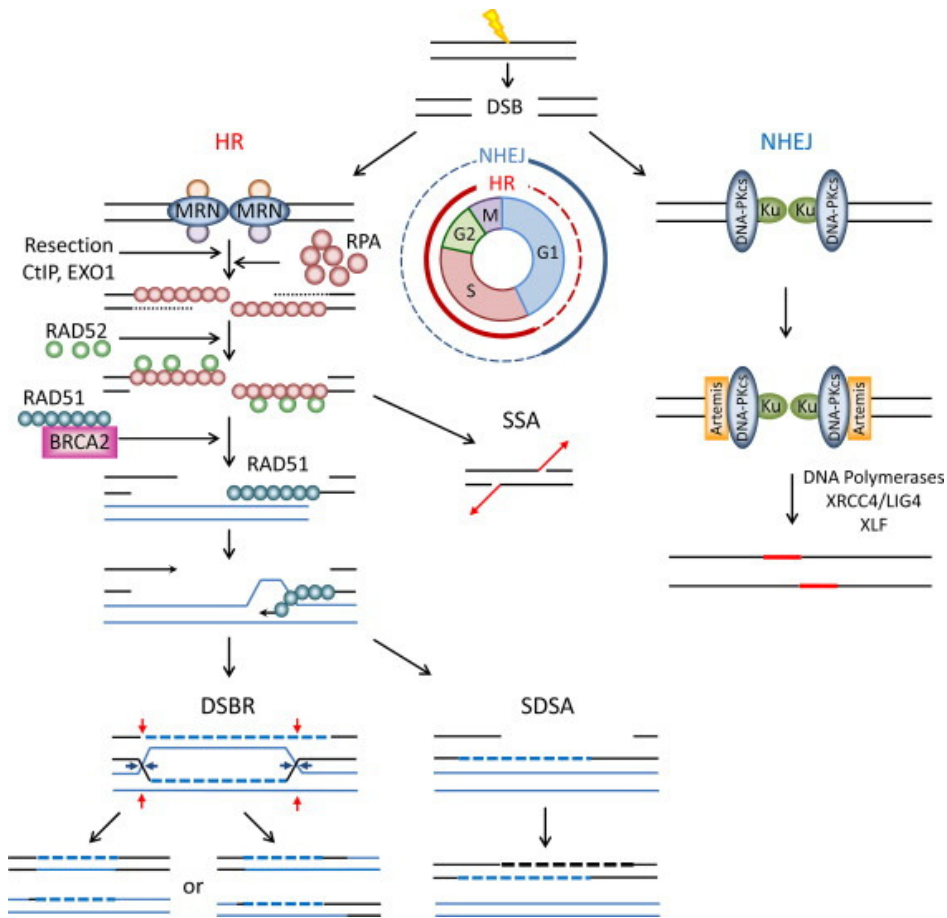


Şekil 3. DNA çift zincir kırıklarında NHEJ onarım basamakları (103)

Homolog olmayan uç birleştirmenin son basamağı, ilk olarak ortadan kaldırılan bazların yerlerine yenilerinin getirilmesi ve sonra da DNA uçlarının birleştirilmesini içerir. Homolog olmayan uç birleştirme onarımında rol alan ek faktörler arasında PNKP ve BRCA1 bulunur. BRCA1, MRN kompleksine bağlanır ve bu etkileşimin in vitro uç birleştirmede önemli olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, NHEJ sırasındaki in vitro BRCA1 işlevi henüz açık değildir (8).

Genel olarak, DSB'lerin HR tarafından onarımının hücre çevriminin son basamaklarında en aktif olduğu düşünülür (geç S ve G2) çünkü kardeş kromatidler, homolog kromozomlar ya da DNA tekrarları biçiminde homolog dizilimler gerekmektedir. Hasarlı dizilimin homolog

dizilimi şablon olarak kullanılır ve tek bir baz bile kaybedilmez ya da değiştirilmez; bu durum, bu onarım türünü hatasız kılar. Bununla birlikte, ender olsa da hata yapılsa bile, HR çaprazlamalara ve heterozigotluğun kaybına (LOH) neden olabilir; ve HR olayları homolog dizilimler arasında çaprazlama sonucu verip vermediklerine göre sınıflandırılabilirler. Homolog rekombinasyon tamir basamağı; RAD50–55, RAD57 ve RAD59 ürünlerini içeren, RAD51 paralogları olan RAD51b, c, d ve MRE11'i de içeren RAD52 epistasis protein grubu tarafından gerçekleştirilir. Ayrıca, HR; BRCA proteinlerini (BRCA1, BRCA2), XRCC proteinlerini ve MRN kompleksini de içerir (8).



Şekil 4. Replikasyon aşamaları

Homolog rekombinasyon onarımı sırasında gerçekleştirildiği düşünülen ilk olay DNA'nın kesilerek tek iplikli uzantıların oluşturulmasıdır. Mayada bu kesme işleminin MRN

kompleksini içerdiği düşünülmektedir (Şekil 2). Bu kompleksin endonükleaz etkinliği vardır fakat kesme işlemi için gereken 5'-3' ekzonükleaz etkinliği yoktur. MRN kompleksinin bir üyesi olan NBS1, serin 343 üzerinde ATM tarafından fosforillenir. NBS1 alt biriminin DNA hasar sensörlerinin sinyallerinin MRN'ye aktarımında önemli olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, NBS1'in fosforillenmesinin MRN kompleksinin ekzonükleaz özelliğini etkinleştiriyor olması mümkündür. MRN kompleksinin DNA'yı kesmesine yardımcı başka kofaktörler de gerekebilir (8, 104).

Homolog rekombinasyonun ikinci basamağı iki tamamlayıcı ipliğin açılmasıdır. MRN'nin RAD50 alt biriminin DNA'nın açılmasını kolaylaştırıcı ATPaz etkinliği olduğu düşünülmektedir. Bundan sonra, RPA proteini (insan tek iplikli bağlanma (SSB) proteini) tek iplikli DNA'ya eklenir ve bunun DNA'yı nükleaz etkinliğinden koruduğu ve bakteriyel RECA proteininin eşdeğeri olan RAD51 etkinliğine yardım ettiği düşünülmektedir. RAD51, hasarlı DNA ipliği ile kardeş kromatid üzerindeki bozulmamış DNA arasında kesişmeyi ve değiş tokuşu başlatmak için, RPA ile kaplanmış SS DNA uçlarında nükleoprotein kompleksleri oluşturur. RAD51 paralogları olan RAD55 ve RAD57, yardımcı proteinler olarak hareket ederler ve RAD51'in işini kolaylaştırdıkları düşünülmektedir. Aynı şekilde, RAD52, DNA değiş tokuş ara maddeleri oluşturmaya yardım eder ve RAD54'ün diğer onarım faktörlerinin erişimini kolaylaştırmak için DSB'de DNA'nın açılmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir. BRCA1 ve BRCA2'nin erken HR aşamasında önemli oldukları düşünülmektedir ve belki de onarımın diğer hücrel süreçlerle koordinasyonunu sağlamaktadırlar (Şekil 4) (8, 104, 105).

Bu farklı proteinlerin etkinlikleri, "Holliday kavşağının" oluşumuna neden olur. Bu bağlamda, hasarlı ipliğin tek ipliklerinin her biri, model DNA ipliklerinin bir homolog bölgesiyle eşleşir. Farklı ipliklerin bu çaprazlamasında yüksek bir hassaslık düzeyi gerekmektedir (8, 105, 106). Bundan sonra HR iki ayrı yöne gidebilir. Memeli hücrelerindeki HR sırasında Holliday kavşağının açılması, bunu takiben hasarlı homologda DNA eşleşmesi ve boşlukların doldurulması sonucu, çaprazlamanın olmadığı süreç fazlasıyla tercih edilmektedir. Diğer olasılık ise, klasik yolu izlemektir. Holliday kavşakları endonükleolitik etkinlikle çözülür ve çaprazlamalı ya da çaprazlamasız süreçlerin eşit olasılığı vardır (8, 107, 108).

Son basamak ise, boşlukların DNA polimeraz ile doldurulması ve kırılmaların ligaz ile kapatılmasıdır. Ancak, bu basamak için gereken DNA polimeraz ve ligaz henüz tanımlanmamıştır (8).

DNA çift zincir kırıklarının onarımı, substrat olarak DNA kullanan ve sonra da çıplak DNA'ya erişim gerektiren bir süreçtir. Ancak, bir hücrede çıplak DNA, nükleazla sindirilmeye ve başka saldırılara açıktır ayrıca bir çeşit örgütlenme olmayınca gereğinden daha fazla hacim işgal edecektir. Bunun bir sonucu olarak, ökaryot hücreler DNA'yı kromatin şeklinde sıkıştırırlar (8).

Kromatinin yapısı sadece DNA'yı yoğunlaştırarak ve koruyarak değil, aynı zamanda genetik bilgiyi koruyarak ve gen ifadesini kontrol ederek de temel işlevleri yerine getirir. Ancak, kromatin, bu kompakt yapısıyla DNA kırıklarının saptanması ve onarımı dahil, birkaç önemli hücresel süreci engeller (8).

DNA çift zincir kırıklarının HR ya da NHEJ yoluyla onarımı; birçok enzimin de adaptör proteininin dikkatli işbirliğini içeren karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Ayrıca, DNA onarım araçlarının hasarlı DNA'ya erişimini sağlamak için önce kompakt kromatinin açılmasının gerekmesi büyük bir engeldir (8).

Bu engeli aşabilmek için, öncelikle kromatinin yapısını değiştirerek, kırık DNA'nın onarım faktörlerine erişimi sağlayacak hücresel mekanizmalar çalışmalıdır. Son araştırmalar, onarım faktörlerinin yüksek yoğunluklu kromatindeki kırık DNA'ya nasıl eriştiği ve onarım sürecinin transkripsiyon gibi diğer kromatin bazlı süreçlerle nasıl koordine edildiği konusunda bilgi sağlamaktadır. Bu çalışmalar kromatini yeniden biçimlendiren etkinliklerin DNA onarımıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (8).

Biyokimyasal ve moleküler çalışmalar DNA onarımıyla ilişkili farklı histon modifikasyonları ortaya çıkarmış ve bu modifikasyonlardan sorumlu moleküler oyuncular tanımlamıştır (109).

Kromatini yeniden biçimlendiren etkinlikler, hücreler tarafından DNA kırılmalarının onarımını kolaylaştırmak ve böylelikle kendilerini genomik bütünlüğün karşısındaki sürekli tehlikeye karşı savunmak için tasarlanmışlardır. Bu etkinlikler histonların translyasyon sonrası

modifikasyonlarını ve ATP'ye bağımlı nükleozom mobilizasyonunu (kromatinin yeniden biçimlendirilmesi) içerir (109-111).

Kromatin yapısını değiştirerek DNA onarımını kolaylaştıran bir başka mekanizma, kırılma bölgelerinde histon varyantlarının nükleozomlara değiştirilmesini içerir. DNA onarımı tamamlandıktan sonra kromatin yapısını tekrar oluşturmak için kromatinin yeniden biçimlendirilmesi işleminin tersine çevrilmesi de özel enzimatik etkinlikler gerektirir (111).

Kritik hücresel süreçlerdeki kromatin modifiye edici faktörlerin rollerine uygun olarak, gittikçe artmakta olan kanıtlar anormal kromatin yeniden biçimlenmesinin kanserle ilişkili olduğunu göstermektedir (8, 112).

Son çalışmalar, DNA onarımının ve gen transkripsiyonu ve DNA replikasyonu gibi diğer DNA bazlı süreçlerin kromatini yeniden biçimlendiren etkinliklerin karmaşık koordinasyon gerektirdiği gerçeğini vurgulamaktadır (113, 114). Bu çalışmalar histon proteinlerinin epigenetik bilginin kilit taşıyıcıları olduklarını, genetik bilginin de ötesine geçen temel ve kritik bir düzenleyici sistemi oluşturduklarını ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle, bu bulgular, kritik hücresel süreçlerde ve kanserde kromatin bazlı mekanizmaların rollerinin daha ayrıntılı incelenmesinin temellerini oluşturmaktadır (115-117)

2.2.5.MİDE KANSERİ VE GENETİK

İnsanlardaki kalıtsal genetik kusurlar (mutasyonlar), kimyasalları aktive eden ve detoksifiye eden enzimlerin yapısını ve ifade edilme düzeyini (karsinojen metabolizmasını) etkileyen kişisel genetik farklılıklar, DNA hasarının onarım kapasitesini etkileyen polimorfik/genetik değişiklikler, kanser riskini arttırabilen başlıca genetik faktörlerdir (8).

Polimorfizm, aynı türün farklı bireyleri arasında iki veya daha fazla farklı dizinin varlığıdır. DNA replikasyonu sırasında oluşan hatalar sonucu meydana geldikleri düşünülür. İnsan DNA'sında gen diziliminin %99.9'u birbirine benzemektedir. İnsanlar arasındaki genetik çeşitlilik % 0.1'lik farklılıktan ileri gelmektedir (8, 104).

Polimorfizmlere mutasyonlardan daha sık rastlanır. Tek nükleotit polimorfizmleri, belirli bir baz pozisyonunda meydana gelen tek nükleotid değişiklikleridir (8).İnsan genomunda en çok bulunan genetik çeşitlilik tipi, tek nükleotit polimorfizmleridir (SNP). Tüm genetik varyasyonların %90'ını oluştururlar. İnsan genomunda 10-30 milyon SNP olduğu; iki farklı birey arasında 1250 bp'de bir farklılık olduğu tahmin edilmektedir (8).

Tek nükleotit polimorfizmleri, regülatör sekansları değiştirmekte ve gen ekspresyonunu dolaylı yoldan etkilemektedir. İnsan popülasyonları arasındaki genetik farklılıklar nedeniyle bazı popülasyonlar, bazı hastalıklara daha duyarlıdır (118, 119).

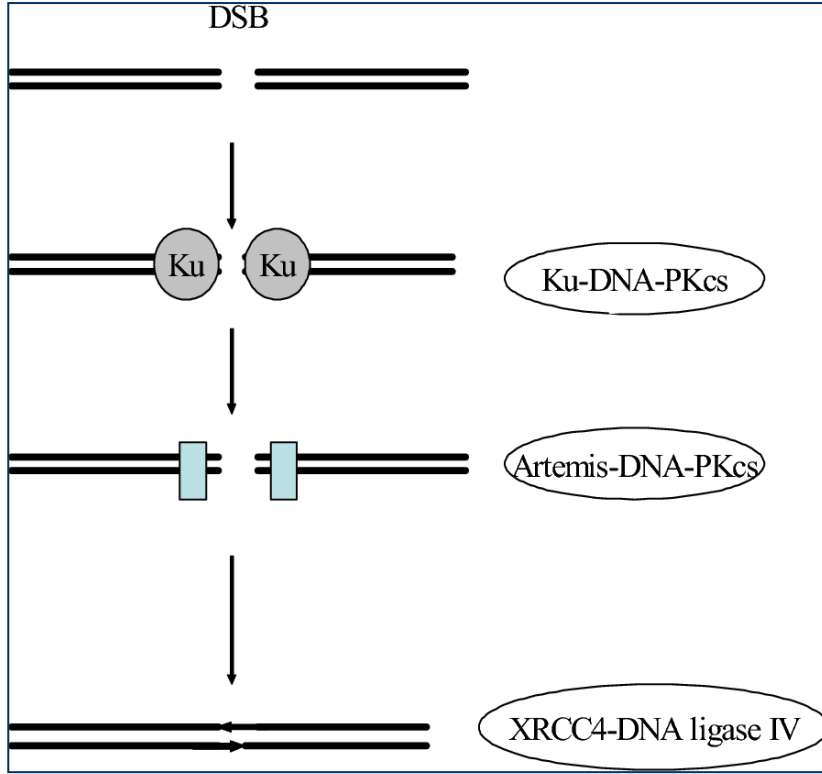
Popülasyonlar arasında görülen genetik farklılıklar, hastalıklara karşı duyarlılık, direnç ve hastalık prognozunu etkileyebilmektedir.

Mide kanseri ile ilgili yapılmış bir çok çalışmada hücre bölünme prosesinde temel basamaklardan biri olan DNA tamir mekanizması ve bu mekanizmanın işleyişini sağlayan DNA tamir genleri üzerinde yoğunlaşmış ve DNA tamir genlerinde meydana gelen polimorfizmlerin genlerin işleyişini ve ekspresyon seviyesini değiştirerek çeşitli kanserlerin oluşumuna yol açabileceği belirtilmiştir (119-122).

2.2.6. KU PROTEİNİ

Ökaryotik hücrelerde DNA çift zincir kırıkları tamirinde Non- Homologous End Joining (NHEJ) ve Homolog Rekombinasyon (HR) olmak üzere iki ana yol vardır (123).

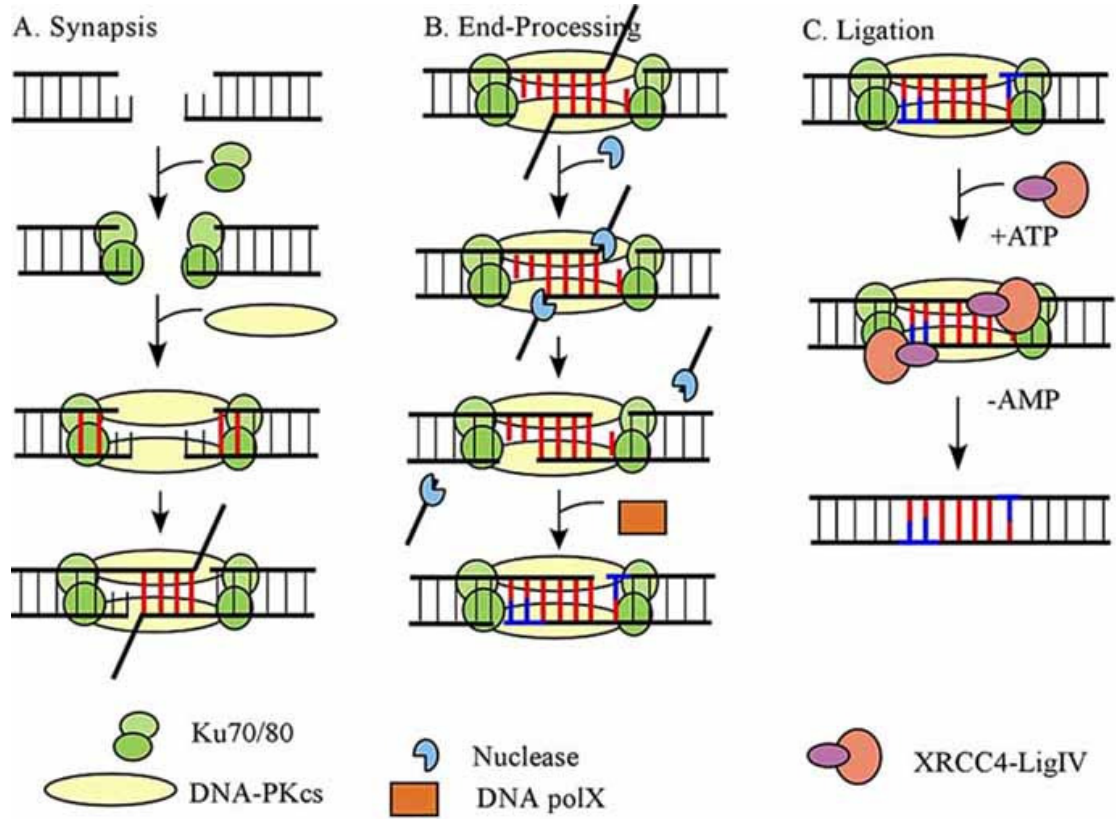
Homolog olmayan uç birleştirme, DNA tamir mekanizmasındaki görevi yanı sıra erken lenfosit gelişimindeki V(D)J gibi spesifik alanlardaki kırıkları da tamir edebilmektedir. NHEJ, DNA bağımlı protein kinazın şifrelenen komponentlerinden (X-ray cross complementing) XRCC5, XRCC6, XRCC7 ile işlev görür (Şekil 5) (124).



Şekil 5. DNA uç kırık tamirinde sinapsis basamağı (125)

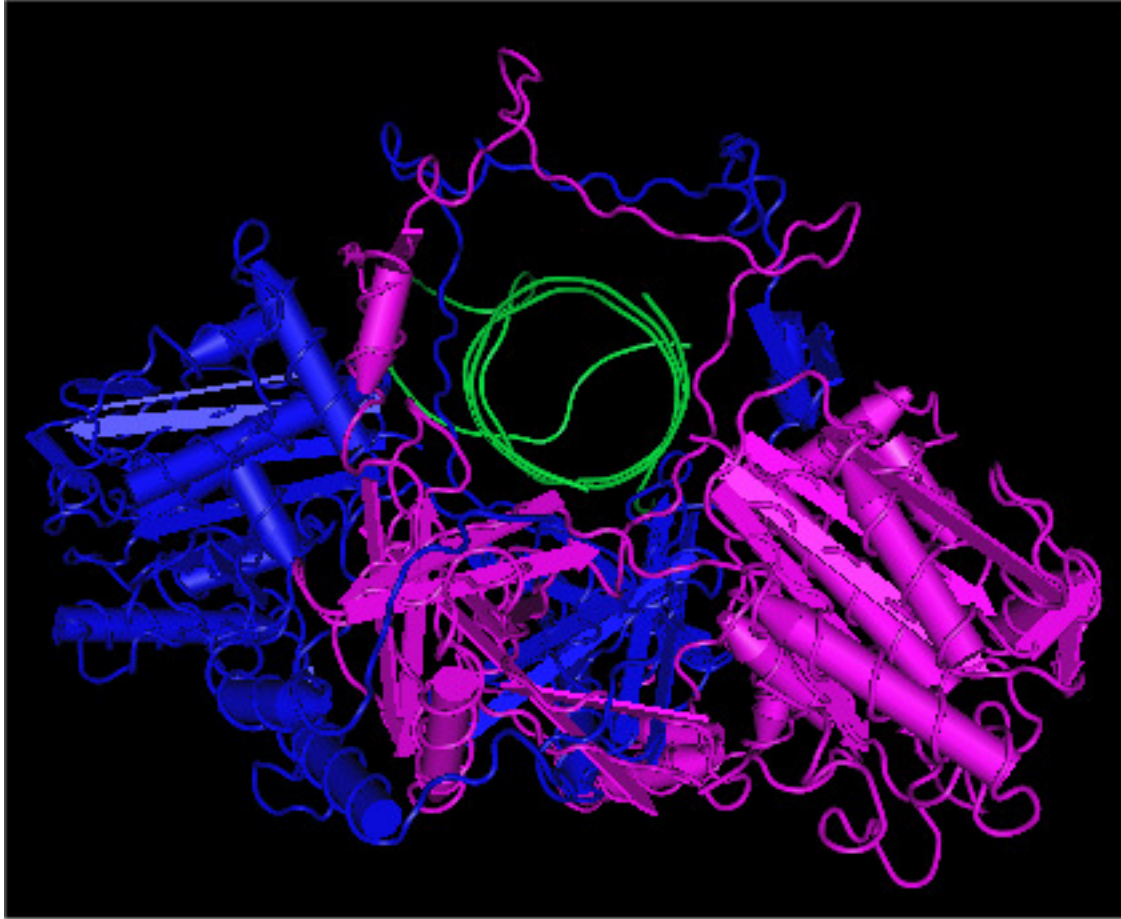
NHEJ mekanizmasının basamaklarında Ku heterodimer, DNA-PK katalitik subuniti ve XRCC4/DNA ligaz IV kompleksi de görev alır (Şekil 5) (126).

NHEJ, hücre bölünmesi boyunca DNA zincir kırıkları tamirinde bir mekanizma oluşturur ve mitotik hücrelerin G₀, G₁ ve erken S fazında önemlidir (124). HR ise geç S fazı ve G₂ fazında, DNA duplikasyonu tamamlandığında işlev görür. HR'nin alternatif bir rolü daha vardır ve bu rol germ hücrelerinde mayoz sırasında homolog kromozomlar arasında gerçekleşen Krossingover olayının düzenlenmesidir (124) (Şekil 6).



Şekil 6. Homolog olmayan uç birleştirmede görevli Ku70/80 ve DNA-PKcs (127)

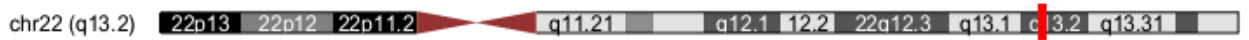
NHEJ ve HR tamir mekanizmalarında görev alan Ku proteini, XRCC gen ailesi tarafından ifade edilen Ku70 ve Ku 80 olmak üzere iki altbirimden oluşan heterodimerik bir proteindir (Resim 1).



Resim 1. Ku heterodimer yapısı- Ku70 mor, Ku80 mavi, DNA yeşil renkte gösterilmiştir (128).

Ku proteini, ökaryotlarda heterodimerik DNA-binding kompleksinden oluşur. Bu kompleks 20 yıl önce Japon sklorederma-polimyozit overlap sendromu olarak adlandırılan otoimmün hastalığa sahip bireylerde major antipedi hedefi olarak bulunmuştur (129).

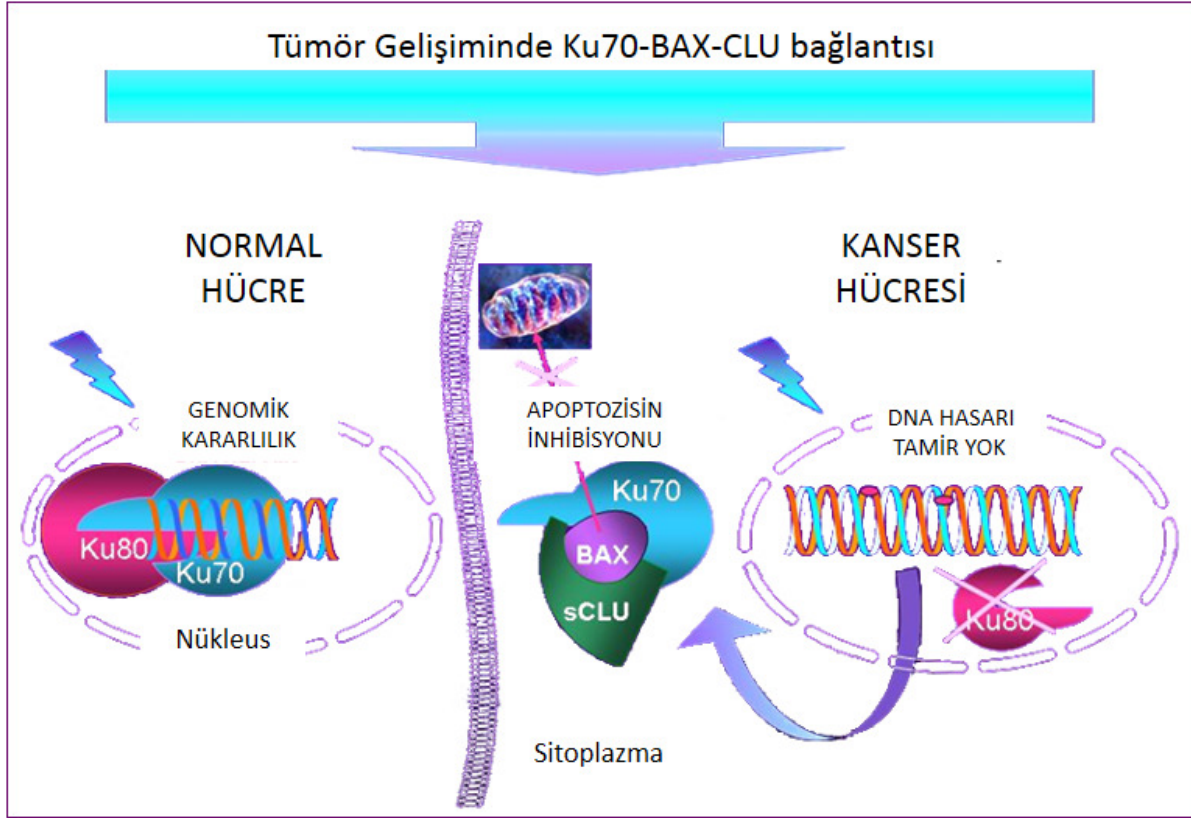
Ku70 geni 22. kromozomun uzun kolunda (22q11-q13) ve Ku80 geni 2. Kromozomun uzun kolunda (2q35) lokalizedir (Şekil 7).



Şekil 7. XRCC6 geni 22. Kromozom q 13.2 bölgesinde lokalize edilmiştir (26).

Ku proteininin en iyi bilinen ve en önemli rolü DNA tamiridir. Yakın zamanda yapılmış çalışmalar Ku proteininin Homolog Recombination (HR) ve Non-homolog End Joining (NHEJ) mekanizmalardaki nükleer bir protein olarak tanımlamaktadır (130). Hücredeki

fonksiyonel Ku proteinleri genomik stabiliteyi korumada, ayrıca hücre ve organizma canlılığını sürdürmede görevlidir (Şekil 8).



Şekil 8. Tümör gelişiminde Ku70 geni (131)

DNA tamirindeki hayati rolünün yanı sıra, Ku başka hücresel proseslerde de görev alır. Bunlar; telomer onarımı, antijen reseptör gen düzenlenmesi, spesifik gen transkripsiyonunun düzenlenmesi, antiapoptosis, ısı-şok proteinleri cevabı ve hücre döngüsünde G2 ve M fazlarının düzenlenmesi görevleridir (129).

2.2.7. KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİ

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction, RTPCR) özellikle gen ifadesi çalışmalarında sık kullanılan bir yöntemdir (68). RTPCR, döngüler sırasında reaksiyonlardan floresan sinyal toplayarak sürekli analize olanak verir. İfadelenmenin yanı sıra amplifikasyonlar, delesyonlar ve nokta mutasyonlarının da çalışılmasına olanak sağlayan bu yöntemin üstünlüğü hızında ve ürünlerin birikiminin gerçek zamanlı izlenebilmesindedir (132). Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda (Q-RT-PCR) ise her reaksiyondan gelen floresan sinyaller her örnek için sayısal bir değere dönüştürülür. Q-RT-PCR yöntemi, genomik DNA kopya sayısını, tek nükleotid polimorfizmlerini, DNA metilasyon durumunu ve viral yükü belirlemede kullanılabilir. En yaygın kullanım alanı ise mRNA düzeylerinin belirlenmesi üzerinden gen ifadelenmesi analizleridir (132).

İfadelenme analizinde başlangıç molekülü mRNA'dır. Örnekten elde edilen mRNA ters transkriptaz reaksiyonu ile cDNA'ya dönüştürülür. Floresan kaynağı olarak primerlere bağlı ya da onlardan bağımsız floresan işaretleyiciler kullanılır. En sık kullanılanlar arasında hidroliz problemleri, hibridizasyon problemleri, TaqMan® problemleri, Molecular Beacon® problemleri ve SYBR® Green I boyası bulunmaktadır. SYBR® Green I boyası reaksiyonda çoğalan her türlü çift zincirli DNA'ya nonspesifik olarak bağlanır ve çift zincirli DNA'nın artışıyla orantılı olarak floresan sinyal verir (132). Her deneyde hedeflenen ampikonun çoğalıp çoğalmadığını, kantifikasyona primer dimerlerinin ve nonspesifik ürünlerin karışmadığını gösterebilmek için, reaksiyon sonrası ürünler jelde görüntülenebilir ya da reaksiyondan sonra erime eğrisi ("melting curve") analizi basamağı eklenebilir (133). Q-RT-PCR çalışmalarında kimi zaman PZR ürünlerinin taşınma kontaminasyonunu önlemek için urasil-N-glikozilaz (UNG) uygulaması kullanılabilir. UNG uygulamasını kullanabilmek için reaksiyona eklenen deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP) karışımında deoksitimidin trifosfat (dTTP) yerine deoksiuridin trifosfat (dUTP) olmalıdır. UNG enzimi reaksiyona eklendiğinde, dUTP nükleotidini içeren her türlü olası PZR ürününü sindirir (134).

Q-RT-PCR analizlerinde genel olarak iki kantifikasyon stratejisi izlenebilir; mutlak (absolute) kantifikasyon ya da göreceli (relative) kantifikasyon. Mutlak kantifikasyonda elde edilen sinyaller önceden hazırlanmış bir kalibrasyon eğrisine göre kopya sayısı olarak hesaplanarak sonuç verir. Göreceli kantifikasyon ise belli bir RNA'nın ifadelenme

seviyelerindeki değişimin bir başka RNA'nın ifadenme seviyesine göre oranının ölçülmesine dayanır. Görelî kantifikasyonda kesin konsantrasyonları bilinen standartlara ya da kalibrasyon eğrisine ihtiyaç yoktur, dizisi bilindiği sürece her türlü transkript referans olarak kullanılabilir. En sık kullanılan referanslar sabit ifadelendiği bilinen genler (house-keeping genler) ve evrensel ya da yapay kontrol RNA / DNA molekülleridir. Görelî kantifikasyonda bir basamak daha eklenerek bu görelî sonuçlar bir kontrol hastasına, tedavisiz bir örneğe ya da olgunun sıfır anındaki örneğine oranlanabilir. Bu basamağa normalizasyon adı verilir (135).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Genel Cerrahi Servisi'nde 2006-2008 tarihleri arasında mide kanseri tanısı almış 92 hastaya ait periferik kandan veya normal dokudan elde edilmiş arşiv DNA'ları kullanılmıştır. Hasta grubu ile yaş ve cinsiyet açısından uyumlu, gönüllü olur formu (Bkz: Ek1) ile onayları alınmış 194 sağlıklı birey ile kontrol grubu oluşturulmuştur.

3.1. Kullanılan Araç Ve Gereçler

- PCR tüpü
- Eppendorf Tüpü
- Mavi Pipet Ucu
- SarıPipet Ucu
- DNA Saklama Kutusu
- Tüp Sporu
- UV spektrofotometre
- Mikrosantrifüj
- Otoklav
- Etüv
- Buzdolabı
- Derin Dondurucu
- Kar Makinası
- Bidistile Su Cihazı
- Su Banyosu
- PCR Kabini
- Vorteks
- Hassas Terazî
- Mikrodalga Fırın
- Manyetik Karıştırıcı
- Elektroforez Tankı
- Elektroforez Güç Kaynağı
- Transilüminatör

- Real Time PCR cihazı

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- EDTA
- Etanol
- Etidyum Bromid
- Pure Gene Blood Core Kit B
- Pure Link Genomik DNA Kit
- Taq DNA Polimeraz
- Agaroz (Serva 11380)
- 10xPCR Buffer
- Bidistile Su
- Molecular weight marker DNA
- Primerler

3.3. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Retrospektif olarak yaptığımız çalışmamızda hasta DNA'ları laboratuvarımız DNA bankasında mevcut olup, tuzla çöktürme yöntemi ile elde edilmiştir (136).

Çalışmamızı planladıktan sonra ailesinde kanser öyküsü olmayan, sağlıklı, cinsiyet ve yaş açısından hasta grubu ile uyumlu kişilerden onam formu (Bkz: Ek1) doldurularak, imzaları eşliğinde kan örnekleri alınmıştır.

Kontrol grubundan alınan 4cc periferik kandan DNA elde etme kiti ile DNA elde edildi. Bu kitin (Bioneer DNA ekstraksiyon kiti- AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit) muhteviyatına göre;

- 1- Proteinaz K, liyofilize, 25 mg
- 2- Binding buffer, 25 ml
- 3- Washing buffer 1, 40 ml
- 4- Washing buffer 2, 20 ml
- 5- Elution buffer, 30 ml

- 6- Bağlanma tüpleri
- 7- Filtrasyon (2ml) tüpleri
- 8- Elüsyon (1,5 ml) tüpleri

Ek Malzeme Listesi:

1. Abzolu etanol
2. Abzolu izopropanol
3. Masa üstü mikrosantrifüj
4. İnkübatör
5. Vorteks karıştırıcı
6. Ependorf tüpleri (1.5 ml)
7. PBS (Fosfat buffer salin)

Protokol:

- 1- 1.5 ml'lik ependorf tüpüne 20 µl Proteinaz K konuldu.
- 2- İçinde proteinaz K bulunan ependorf tüpüne 200 µl periferik kan eklendi.
- 3- İçinde proteinaz K ve kan bulunan ependorf tüpüne 200 µl Binding buffer (bağlanma solüsyonu) eklendi.
- 4- Ependorf tüpü içindeki karışım ile inkübatörde 60 C'de en az 10 dk inkübe edildi.
- 5- İnkübatörden alınan tüpe 100 µl izopropanol eklenerek pipetaj yapıldı.
- 6- Ependorf içindeki karışım 2 ml'lik bağlanma tüplerine aktarıldı.
- 7- Mikrosantrifüj aletinde 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- 8- Bağlanma tüpü altta biriken sıvı atılarak yeni bir tüpe geçirildi.
- 9- Ardından 500 µl yıkama solüsyonu eklenilir ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- 10- Altta biriken sıvı atılarak 2 numaralı yıkama solüsyonundan 500 µl eklenildi ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- 11- Tüpteki etanolün tamamen uzaklaşması için bir kez daha 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj işlemi tekrarlandı.
- 12- Bağlanma tüpü 1.5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı, üzerine 200 µl elüsyon buffer eklendi.
- 13- Mikrosantrifüj aletinde 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Ependorf tüpüne aktarılan DNA saklanmaya veya çalışmaya hazır hale getirildi.
- 14- Elde edilen DNA'lar Nano Drop DNA ölçüm cihazı ile ölçüldü.

15- Elde edilen DNA'lar 11,25 µl'de 10 ng olacak şekilde distile su ile dilüe edildi.

16- DNA'lar elde edildikten sonra normal şartlarda hemen çalışılacaksa + 4 C'de, daha sonra çalışılacaksa – 20 C'de saklanabilir.

3.4. Ku70 Polimorfizmlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi İle Çoğaltılması

Allelik diskriminasyon yöntemi ile;

ABI 7300 Real Time PCR cihazı ile (Applied Biosystems)

Kullanılan reaktifler;

- TaqMan Universal PCR Master Mix Without AmpErase UNG (Invitrogen)

- 40 x SNP Genotyping Assay (Invitrogen)

Ku70... promotör G-57C (rs2267437)

Ku70... intron3 (rs132774)

Protokol:

Tabloda belirtilen oranda karışım hazırlanarak kuyucuklara dağıtılmıştır. Üzerine her bir örnek başına 5 µl DNA eklenmiştir.

Eklene malzeme	Miktar
TaqMan Univ. PCR Master Mix	12.50 µl
20 x SNP Genotyping Assay	1.25 µl
DNA	11,25 µl

Tablo 1. Çalışma protokolü

3.4.1. Ku70 Promotor Bölgelerinin Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri

Context Sequence [VIC/FAM]; rs 132774:

TTTTTGTTAAAATTTGATATTTATG[C/G]CCATTACTTCACTGATTCATTACC

Context Sequence [VIC/FAM]; rs 2267437:

GCCCAAGTCTCCCCACCTCGGCCAG[C/G]CGCCACCCTCTGGCCTGGCTCCCGC

3.4.2.Real Time PCR Koşulları

PCR basamakları	Isı (°C)	Süre
Denatürasyon	96	10 dk
Annealing	92	15 sn
Elongasyon	60	60 sn

Tablo 2. PCR basamakları

Bildiğimiz PCR yöntemi, 1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri' nde bulunan Cetus şirketine bağlı olarak çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilen, nükleik asitlerin, uygun in vitro koşullar altında çoğaltılmasına dayanmaktadır. Hem bilimsel araştırmalar hem de klinik laboratuvar tanısındaki uygulama alanlarıyla büyük öneme sahip olan PCR' nin geliştirilmesindeki çalışmaları nedeniyle Kary Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülü' nü almaya hak kazanmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu bir çeşit in vitro klonlamadır.

Real Time PCR ise; klasik PCR yöntemi ve gen analizinin birleştirilmesinden oluşur. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir.

Real Time PCR TaqMan sisteminde, 5' ve 3' uçlarından florokrom (floresans veren) maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probon 5' ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein= 6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı (quencher) florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine=TAMRA) bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Proba hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece

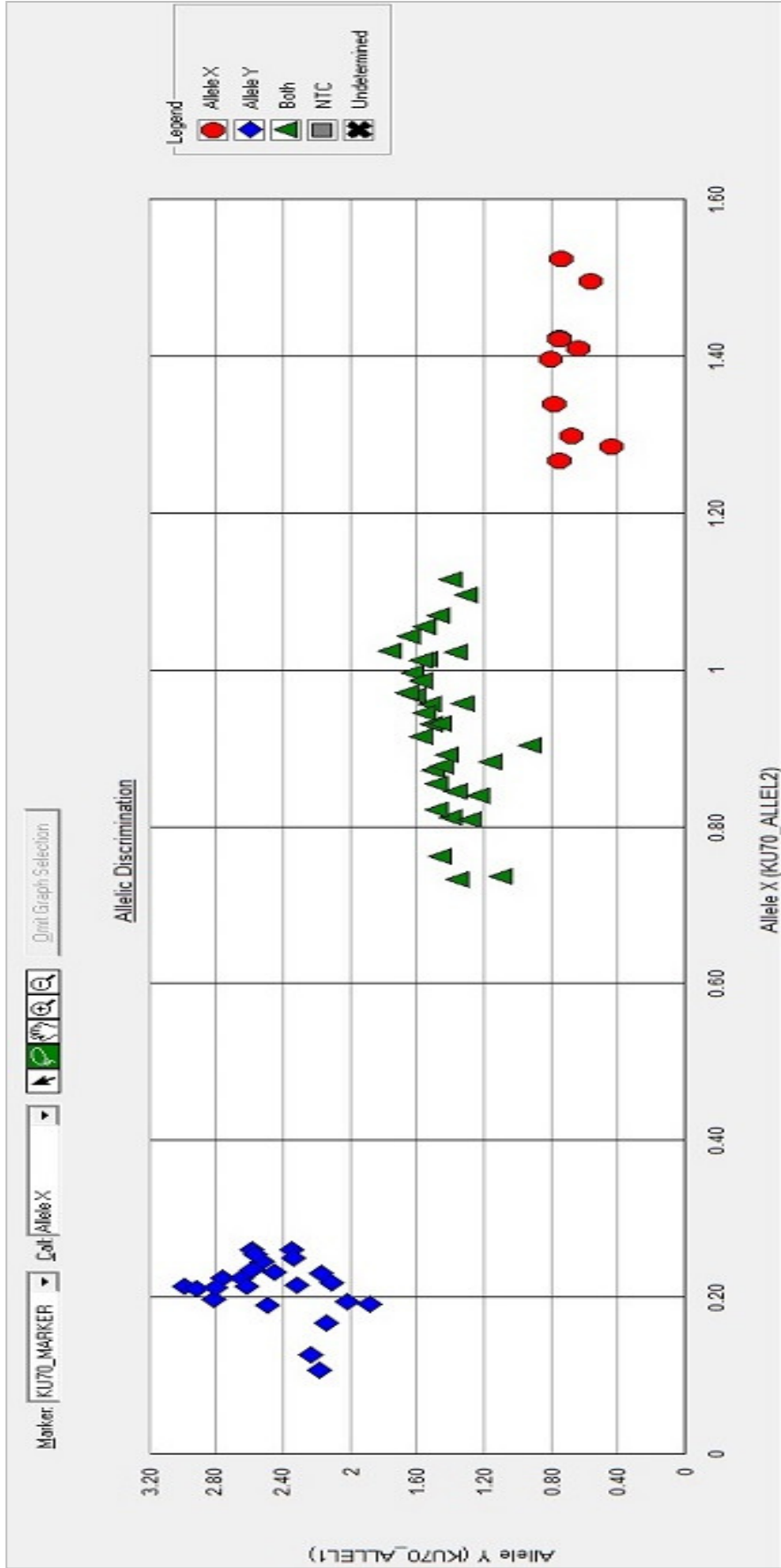
raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (137).

Real-time PCR, kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski düşüktür. Elektroforeze gerek kalmadan çoğalma esnasında sonuç alınabilmektedir. Ayrıca floresan veren probler kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir (137).

4. BULGULAR VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Hastaların ve kontrol grubunun DNA örnekleri gerçek zamanlı multipleks PCR protokolüne göre hazırlanarak sonuçlandırılmıştır. Değerlendirme aşağıda örnekleri bulunan görüntülere göre yapılmıştır. Analiz dahilinde iki polimorfizm üç farklı genotip açısından her birey için kaydedilmiştir.

Allelik ayırlama neticesinde bireyler CC/CG/GG genotiplerine göre üç grupta sınıflandırılmıştır (Şekil 9).



Şekil 9. Allelik ayırılma analizi sonuçları

Her olgunun analiz sonucu verdiği anlamlı eğrilere göre yorumlanmıştır. Bu yorum gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu neticesinde tek bir yeşil (VIC) renkte anlamlı eğri çizmesi durumunda aşağıdaki örnekte görüldüğü üzere CC genotipi olarak değerlendirilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. CC Genotipi sonuç eğrisi

Heterozigot genotipte olguların analiz sonuçları FAM/VIC yani lacivert ve yeşil renkte iki eğrinin bir arada bulunması halinde CG olarak değerlendirilmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. Heterozigot genotipe sahip bir sonuç örneği

Çalışmaya dahil edilen olgulardan analiz sonucu homozigot GG genotipinde bulunanlar ise tek bir FAM-lacivert renkte floresans vermesi ve tek bir eğri çizmesi ile anlaşılmıştır (Şekil 12).



Şekil 12. GG genotipinde bir sonuç örneği

Olgu ve kontrol grubunun analiz sonuçları SPSS programına yüklenmiştir. Sonuçlar Ki-Kare testi ile değerlendirilmiştir. Araştırma dahilinde bakılan Ku70 genine ait intron 3 (rs132774) ve G-57C (rs2267437) polimorfizmleri açısından her birey için üç alternatif genotip sözkonusudur. Bireylere ait demografik bilgiler yaş ve cinsiyet olarak belirlenmiştir. Bu veriler birbiri ile kıyaslanmış, sayılar ve yüzde oranlar tablolar aracılığı ile özetlenmiştir.

Olgular ve kontrol grubu G-57C (rs2267437) polimorfizmi GG genotipi açısından birbiri ile karşılaştırıldığında hem sağlıklı hem de kanserli hastalarda benzer oranlara rastlanmıştır (Tablo 3).

rs2267437 polimorfizmi	Olgular Sayı (%)	Kontrol Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
GG olanlar	15 (28,3)	38 (71,7)	53 (100)
GG olmayanlar	77 (33,0)	156 (67,0)	233 (100)
Toplam sayı	92 (32,2)	194 (67,8)	286 (100)
Ki-Kare $p > 0.5$			

Tablo 3. rs2267437 polimorfizmi GG bulunanlar- Ki-Kare Testi

Olgular ve kontrol grubu rs2267437 polimorfizmi GC genotipi açısından birbiri ile karşılaştırıldığında hem kontrol grubunda hem olgularda görülme sıklığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 4).

rs2267437 polimorfizmi	Olgular Sayı (%)	Kontrol Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
GC olanlar	77 (33,2)	155 (66,8)	232 (100)
GC olmayanlar	15 (27,8)	39 (72,2)	54 (100)
Toplam sayı	92 (32,2)	194 (67,8)	286 (100)
Ki-Kare $p > 0.5$			

Tablo 4. rs2267437 polimorfizmi GC olanlar- Ki-Kare Tablosu

Olgular ve kontrol grubu G-57C (rs2267437) polimorfizmi CC genotipi açısından birbiri ile karşılaştırıldığında CC genotipinin olgularda hiç görülmediği; kontrol grubunda ise sadece bir kişide görüldüğü saptanmıştır (Tablo 5).

rs2267437 polimorfizmi	Olgular Sayı (%)	Kontrol Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
CC olanlar	0 (0,00)	1 (100)	1 (100)
CC olmayanlar	92 (32,3)	193 (67,7)	285 (100)
Toplam sayı	92 (32,2)	194 (67,8)	286 (100)
Ki-Kare p > 0.5			

Tablo 5. rs2267437 polimorfizmi CC olanlar- Ki-Kare Tablosu

Olgular ve kontrol grubu intron 3 (rs132774) polimorfizmi GG genotipi açısından birbiri ile karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 6).

rs132774 polimorfizmi	Olgular Sayı (%)	Kontrol Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
GG olanlar	47 (30,5)	107 (69,5)	154 (100)
GG olmayanlar	45 (34,1)	87 (65,9)	132 (100)
Toplam sayı	92 (32,2)	194 (67,8)	286 (100)
Ki-Kare p > 0.5			

Tablo 6. rs132774 polimorfizmi GG olanlar- Ki-Kare Tablosu

Olgular ve kontrol grubu rs132774 polimorfizmi GC genotipi açısından birbiri ile kıyaslandığında hem kanserli hastalarda hem kontrol grubunda benzer oranlara rastlanmıştır (Tablo 7).

rs132774 polimorfizmi	Olgular Sayı (%)	Kontrol Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
GC olanlar	37 (32,7)	76 (67,3)	113 (100,0)
GC olmayanlar	55 (31,8)	118 (68,2)	173 (100,0)
Toplam sayı	92 (32,2)	194 (67,8)	286 (100,0)
Ki-Kare p > 0.5			

Tablo 7. rs132774 polimorfizmi GC olanlar- Ki-Kare Tablosu

Araştırmamız dahilinde çalışmış olduğumuz intron 3 (rs132774) polimorfizmi için CC genotipi, olgularda ve kontrol grubunda nadir görülmüş olup, Ki-Kare testi sonucunda anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Tablo 8).

rs132774 polimorfizmi	Olgular Sayı (%)	Kontrol Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
CC olanlar	8 (42,1)	11 (57,9)	19 (100,0)
CC olmayanlar	84 (31,5)	183 (68,5)	267 (100,0)
Toplam sayı	92 (32,2)	194 (67,8)	286 (100,0)
Ki-Kare $p > 0.5$			

Tablo 8. rs132774 polimorfizmi CC olanlar- Ki-Kare Tablosu

Çalışmamıza dahil ettiğimiz 92 tane mide kanserli hastanın 63'ü erkek, 29'u kadın; kontrol grubunun ise 134 tanesi erkek, 60'ı kadınlardan oluşmaktaydı (Tablo 9).

Cinsiyet	Olgular Sayı (%)	Kontrol Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
Erkek	63 (68,5)	134 (69,1)	197 (100,0)
Kadın	29 (31,5)	60 (30,9)	89 (100,0)
Toplam sayı	92 (32,2)	194 (67,8)	286 (100,0)

Tablo 9. Olgu ve kontrol grubu ve cinsiyetleri

Olgular ve kontroller 55 yaş üstü ve altı olarak iki yaş grubuna ayrılarak değerlendirildiğinde 55 yaş üstü bireylerde mide kanseri görülme oranının anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 10).

55 yaş üstü ve altı bireyler	Olgular Sayı (%)	Kontrol Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
55yaş<	18 (19,6)	66 (34,0)	84 (29,4)
55yaş>	74 (80,4)	128 (66,0)	202 (70,6)
Toplam sayı	92 (100,0)	194 (100,0)	286 (100,0)
Ki-Kare $p < 0.5$			

Tablo 10. Yaş gruplarına göre olguların dağılımı

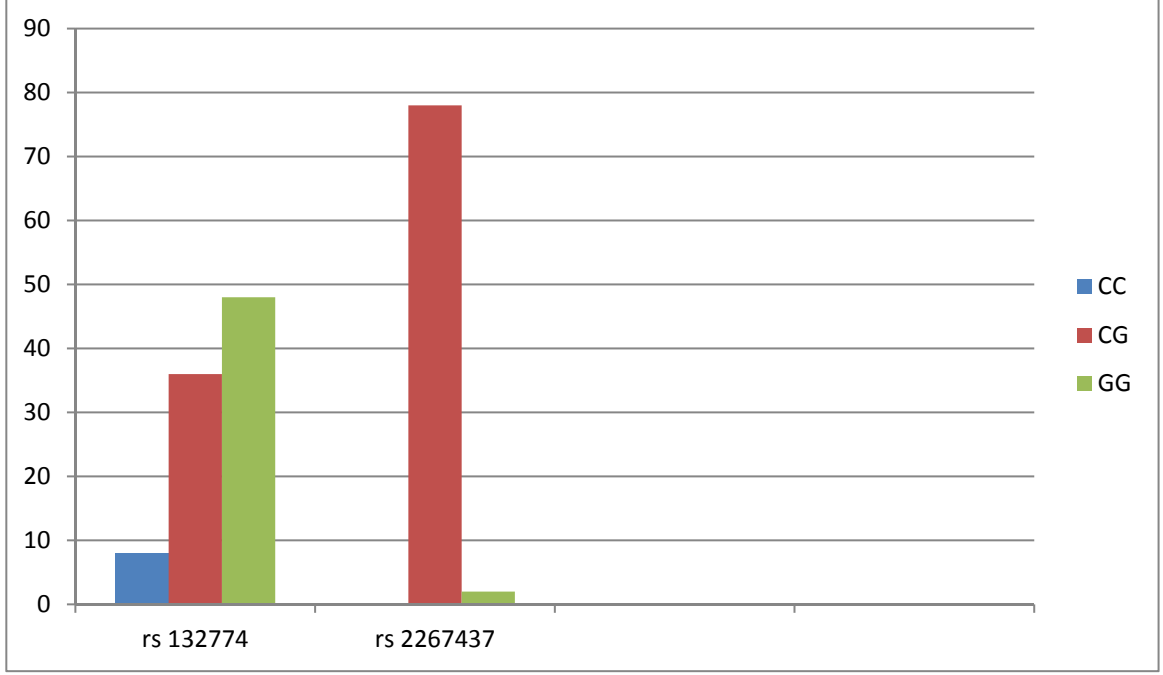
Olgular ve kontrol grubu arasında incelenen polimorfizmlere ait genotiplerin görülme oranlarını birbiri ile kıyasladığımızda ise GG genotiplerini referans aldığımızda bulduğumuz sonuç genotipler arasında mide kanseri riski açısından anlamlı bir farklılık olmadığı idi (Tablo 11).

	Olgular	Kontrol Grubu	Adjusted OR	P değeri
rs2267437 polimorfizmi				
GG genotipi	15	38	1.00(ref)	,782
GC genotipi	77	155	1,291	,483
CC genotipi	0	1	,000	1,000
rs132774 polimorfizmi				
GG genotipi	47	107	1.00(ref)	,523
GC genotipi	37	76	1,086	,774
CC genotipi	8	11	1,808	,255

Tablo 11. Polimorfizmler ve mide kanseri riski; Adjusted OR: Düzeltilmiş oran

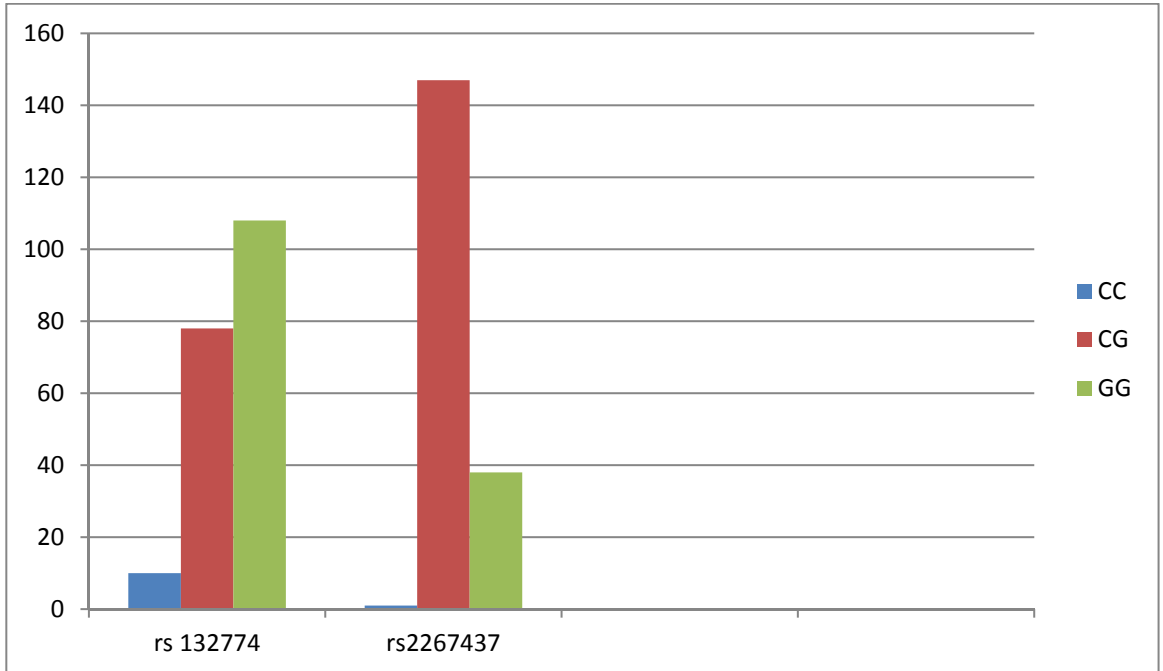
Bu çalışmada, mide kanseri ile Ku70 genine ait polimorfizmler arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Genel Cerrahi AD'da Mide Kanseri tanısı konmuş 92 hastadan alınan periferik kan ve normal dokulardan elde edilen DNA ile Real Time PCR yöntemi kullanılarak Ku70 rs132774 ve rs2267437 polimorfizmlerinin allel ve genotipik tayinleri yapılmıştır.

Çalışmamızda hasta grubumuz 29 kadın ve 63 erkek bireyden oluşmuş ve genel yaş ortalamalarının 60,2 olduğu saptanmıştır. Allel frekansları belirlenen Ku70 genotipleri istatistiki olarak SPSS programı üzerinden Ki-Kare Testi ile değerlendirilmiştir(Tablo 12).



Tablo 12. Olguların genotip oranları

Kontrol grubu olarak yaş ve cinsiyet bakımından hasta grubu ile uyumlu 194 kanseri olmayan birey çalışmaya alınmıştır. İncelenen iki polimorfizm; kontrol grubunda, hasta grubunda bulunan allel oranları ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir (Tablo 13).



Tablo 13. Kontrol grubunun polimorfizm sonuçları

5. TARTIŞMA

Mide kanseri multifaktöriyel bir hastalık olup birçok gen ve çevresel faktör hastalıkta etkilidir. Yaklaşık on yıldır mide kanseri insidansı ve mortalitesinin düşmesine rağmen dünyada hala en sık rastlanan dördüncü ve en fazla ölüme sebep olan ikinci kanser türüdür (21, 138).

Mide kanserinin görülme oranı cinsiyetler arasında farklı seyretmektedir. Mide tümörlerinin görülme sıklığının erkeklerde iki kat fazla olduğu literatürde bildirilmektedir (139). Mide kanserlerinde cinsiyet farkının sağkalım üzerine etkisi bildirilmemiştir. Erkek/Kadın oranında erkekler lehine sayının fazlalığı (E/K=1.87) göze çarpmaktadır. Mide kanserinin ortalama teşhis yaşı 56'dır. Çalışma grubumuzdaki yaş ortalaması yabancı kaynaklarla kıyaslandığında benzerdir. Batı toplumlarında en sık 70'li yaşlarda görülmesine karşın ülkemizde ortalama yaş on yaş daha gençtir. Türk onkoloji grubunun 2008 yılında 840 hastadan oluşan çalışmasında mide kanserlerinin saptanma yaşı ortalama 57'dir (yaş aralığı 19-85) (140). Çalışma grubumuz 92 hastadan oluşmaktadır ve yaş ortalaması ise 60.2'dir (yaş aralığı 33-89). Aradaki farkın hasta sayısının azlığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Kanser genetiğinde en önemli konulardan biri DNA tamiridir. DNA tamir genlerinde meydana gelen polimorfizmler aminoasit dizisinde değişikliğe ve DNA tamir kapasitesinde hasara sebep olup, çeşitli kanserlere neden olabilmektedir. DNA'da meydana gelen hasarlar, proteinlerin görevli olduğu birden fazla yolla tamir edilir.

DNA tamir mekanizmasındaki genetik polimorfizmler DNA tamir kapasitesinde kişisel farklılıklara yol açabilmekte ve kısmen de olsa hücrelerin genotoksik ajanlara karşı hassasiyetini değiştirerek kanser hücresine dönüşmesine sebep olabilmektedir.

DNA tamir sistemlerinin, karsinogen ve antikanser ajanların neden olduğu DNA hasarlarını düzelttiği ve yetersiz yada hatalı DNA tamir mekanizmalarının çeşitli maligniteler için bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (141). Bugüne kadar, DNA tamirinde rol oynayan genlerde çeşitli polimorfizmler tespit edilmiştir (141). Birçok çalışmada DNA tamir genlerinin polimorfizmlerinin mide kanseri riskine etkisi araştırılmışsa da henüz ilişkisi kesin olarak belirtilememiştir (6). Çalışmamızda incelediğimiz Ku proteini memeli hücrelerinde DNA çift zincir kırıkları tamirinde major role sahiptir (129, 142).

Örneğin Bau ve arkadaşları, 2008 yılında, 1998-2007 yılları arasında oral kanser tanısı almış 380 hasta ve bu gruba yaş ve cinsiyet bakımından uyumlu aynı sayıda sağlıklı kontrol grubu ile yapmış oldukları çalışmada, Ku70 T-991C, C-57G ve A-31G polimorfizmleri ile oral kanser arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. C alleli taşıyan bireylerin (T/C ve C/C) T/T (wild) genotipe oranla 2,14 kat daha fazla oral kanser riski taşıdıkları belirtilmiştir. Çalışılan C-57G ve A-31G polimorfizmleri için ise alelik frekans ve oral kanseri ilişkisi hastalar ve kontrol grubunda anlamlı bir fark göstermemiştir (16).

Bir diğer çalışmada ise He ve arkadaşları, Ku70 -1310C/G polimorfizmi ve meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. 293 Meme kanserli hasta ve 301 kontrol grubu ile yapmış oldukları çalışmada, CG ve GG allel frekansına sahip bireyler CC homozigot allele karşılaştırıldıklarında daha yüksek risk taşıdıkları belirtilmiştir ($p= 0,038$) (12).

Bir diğer örnek olarak Willems ve arkadaşlarının (2009), yapmış oldukları çalışmada ise ailesel olmayan meme kanseri ile Ku70 promotör bölgesinde meydana gelen C-1310G tek nükleotit polimorfizmi ilişkisini araştırmışlardır; 206 hasta ve 171 kontrol bireyden oluşan çalışma grubunda sonuç değerlendirildiğinde; endojen östrojen seviyesi yüksek meme kanserli hasta grubunda CG allelinin anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (11). Bahsi geçen Ku70 geni polimorfizmleri kanser gelişim mekanizmalarını aydınlatmak açısından araştırılmaya adaydır (143).

Taiwan'da, Yang ve arkadaşları tarafından 2011 yılında, mide kanserli hastalar ve sağlıklı kontrol grubunda Ku70 genine ait dört polimorfizm çalışılmıştır. Çalışmaya 136 mide kanserli hasta ve 560 kontrol grubu dahil edilmiştir. TC ve CC genotipli bireylerin TT genotipe oranla anlamlı derecede mide kanseri riski bulundurduğu belirtilmiştir. Çalışılan polimorfizmlerden Ku70 promotör T-991C (rs5751129), 55 yaş üzeri erkek hastalarda anlamlı bulunmuş ve bu polimorfizmin mide kanseri hastalarında potansiyel bir biyomarkır olabileceği öne sürülmüştür (6).

Çalışmamızda mide kanseri ve Ku70 geni polimorfizmleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Mide kanserlerine yönelik Ku70 polimorfizmleri açısından benzeri bir çalışma henüz ülkemizde yapılmamıştır.

Çalıştığımız polimorfizmlerden Ku70 promotör G-57C (rs2267437), Fu ve arkadaşları tarafından 2003 yılında yapılan bir araştırmada meme kanseri ile ilişkili bulunmuştur. Mide dokusunda ise Ku70 G-57C (rs2267437) promotör bölgede bulunduğu için farklı genotiplerinin farklı ekspresyonlara neden olabileceği düşünülmektedir.

Araştırdığımız Ku70 G-57C (rs2267437) ve Ku70 intron 3 (rs132774) polimorfizmlerindeki varyasyonlar Ku70 proteininin farklı derecelerde ekspresyon seviyelerini belirlemekte, DNA tamir kapasitesi ve tüm genom stabilitesini etkilemekte ve sonuçta karsinogeneze rol oynamaktadır. Karsinogeneze yönelik mekanizmalarla ilgili geçmişte yapılmış çalışmalar mevcuttur. Örneğin Hu ve arkadaşları 2010 yılında, sadece Ku70 proteini değil; TRF, TERT, BRCA gibi diğer proteinlerle yaptıkları bir çalışmada bu proteinlerin ekspresyon seviyelerinin telomer boyu kısılması ve karsinogeneze bağlantılı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Son yirmi yıldır DNA tamirinde NHEJ basamağında sorumlu olan Ku70 ve Ku80 proteinlerine yönelik fare deneyleri ve hasta bazlı araştırmalar yapılmaktadır. İlk çalışmalar Sistemik Lupus Eritematosus gibi bağ dokusu hastalıklarına yönelik olmuştur (144). Daha sonra ise çift taraflı pterigium patolojisi, oral kanserler, deri kanserleri, hepatik kanserler olmak üzere pek çok kanser türünde bu tamir genlerine yönelik genetik varyasyonlar çalışılmıştır. Bu kanser araştırmalarında büyük kontrol grupları seçilerek çalışmalar yürütülmektedir (143).

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Genetik AD ve Genel Cerrahi AD işbirliği ile yaptığımız çalışma 92 tane mide kanserli hasta ve 194 tane gönüllü kontrol temel alınarak yapılmıştır. Sonuçlar Ki-Kare testi ile değerlendirilmiştir. Değerlendirilen polimorfizmler ve mide kanserli hasta örnekleri ve sağlıklı kontrol grubuna ait örnekler kıyaslandığında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Olgular ve kontrol grubu G-57C (rs2267437) polimorfizmi GG genotipi açısından birbiri ile karşılaştırıldığında her iki grupta da benzer oranlara rastlanmıştır. Olgular ve kontrol grubu G-57C (rs2267437) polimorfizmi GC genotipi açısından birbiri ile karşılaştırıldığında görülme sıklığı açısından iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Olgular ve kontrol grubu G-57C (rs2267437) polimorfizmi CC genotipi açısından birbiri ile karşılaştırıldığında CC genotipinin olgularda hiç görülmediği; kontrol grubunda ise sadece bir kişide görüldüğü saptanmıştır. Olgular ve kontrol grubu intron 3 (rs132774) polimorfizmi GG genotipi açısından birbiri ile karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark görülmemiş ve GC genotipi açısından kıyaslandığında her iki grupta benzeri oranlara rastlanmıştır. Araştırmamız dahilinde çalışmış olduğumuz intron 3 (rs132774) polimorfizmi için CC genotipi kanserli kişilerde ve kontrol grubunda nadir görülmüş olup, Ki-Kare testi sonucunda anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Buna göre mide kanseri ile Ku70 geni

intron 3 (rs132774) ve G-57C (rs2267437) polimorfizmleri arasında anlamlı bir ilişki çalışmamız neticesinde saptanmamıştır. Yine de net bir yargıya varmak mümkün değildir. Çünkü popülasyona bağlı genetik ifade farklılıkları her zaman sözkonusudur. Çalışmamıza dahil ettiğimiz 92 tane mide kanserli hastanın 63'ü erkek, 29'u kadın; kontrol grubunun ise 134 tanesi erkek, 60'ı kadınlardan oluşmaktaydı. İleride yapılacak çalışmalarda yaş ve cinsiyet açısından olgu ve kontroller arasında uyum olmasına ve daha fazla sayıda olgunun çalışmaya dahil edilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür. Olgular ve kontroller 55 yaş üstü ve altı olarak iki yaş grubuna ayrılarak değerlendirildiğinde 55 yaş üstü bireylerde mide kanseri görülme oranının anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür. Bu bilgi literatür bilgisiyle uyumludur, kansere yatkınlığın ileri yaşta artması şaşırtıcı değildir.

Çalışmamıza daha sonra aynı hasta grubu ile kansere predispozisyon yaratması muhtemel başka DNA tamir gen polimorfizmleri eklenerek devam edilmesi yararlı olacaktır. Muhtemel bir ileri çalışma, mide kanserine yatkınlık açısından bir genetik biyomarkır bulunmasını; böylece ailesinde mide kanseri öyküsü olan veya çevresel faktörler açısından yüksek risk altında olan bireyler için yorumlanabilir kişisel veriler elde edilmesini mümkün kılacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız kapsamında incelemiş olduğumuz mide kanseri multifaktörel bir hastalıktır. Etiyolojide genetik yatkınlık kadar yaş, cinsiyet gibi değiştirilemez faktörler ve beslenme alışkanlıkları, çevresel etkiler gibi değiştirilebilir faktörler sözkonusudur. Genetik açıdan mide kanserli hastalara baktığımızda DNA tamirinden sorumlu Ku70 genlerine ait polimorfizmleri incelemek kanser etiyojisine bir ışık tutması bakımından önemlidir. Daha önce mide kanserli hastalar ve Ku70 geni polimorfizmleri arasındaki bağlantıyı gösteren bir çalışma Taiwan'da yapılmıştır. Türkiye'de henüz mide kanserli hastalar ve Ku70 geni ile ilgili bir çalışma bilgilerimiz dahilinde bulunmamıştır. Mide kanserli hastalar ile ilgili bir araştırma için hasta sayımız yeterli olmakla beraber kanser etiyojisi pek çok faktöre bağlı olduğu için hasta sayısının daha fazla olması gelecek çalışmalar için önemlidir. Çalışmamızda kontrol grubu belirlenirken hem kendisinde hem ailesinde kanser öyküsü olmayan sağlıklı bireyler olmasına özen gösterilmiştir. Gelecekte yapılacak diğer çalışmalarda kontrol grubunun fazla olması çalışmanın daha değerli olması açısından önemlidir. Arşiv materyalinden yararlanarak yaptığımız çalışmamız daha fazla mide kanseri olgusu eklenerek genişletilebilir ve diğer polimorfizmler de çalışmaya dahil edilebilir.

7.ÖZET

Genomda; DNA çift zincir kırıklarının tamirinde homolog olmayan uç birleştirme onarım sisteminin önemli bir üyesi olan DNA tamir geni Ku70'in önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu çift zincir kırık onarımı kapasite bozukluklarının geri dönüşümsüz olarak genomik kararsızlığa yol açtığı bilinmektedir. Ancak, Ku70 genine ait polimorfik varyantlar ve mide kanseri duyarlılığı arasındaki bağlantı Dünya'da ikinci, ülkemizde ise ilk kez tarafımızca çalışılmıştır.

Hastanemiz Genel Cerrahi Bölümü'nde değerlendirilen mide kanserli 92 hasta ve kontrol grubu olarak ailesinde ve kendisinde kanser öyküsü olmayan 194 gönüllü çalışmaya dahil edilmiştir.

Bu kişilerden DNA tamirinde görevli Ku70 proteini ile ilgili iki polimorfizm araştırılmıştır. Bu polimorfizmler intron 3 (rs132774) ve G-57C (rs2267437) polimorfizmleridir. Çalışma yöntemi olarak gerçek zamanlı polimeraz zincir işlemi kullanılmıştır.

Sonuçlar Ki-Kare testi ile değerlendirilmiştir. Değerlendirilen polimorfizmlerde kanserli hasta örnekleri ve sağlıklı kontrol grubuna ait örnekler arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Özet olarak, Ku70 promotör G-57C (rs2267437) ve intron 3 (rs132774) polimorfizmleri ve mide kanseri gelişiminin birbiriyle ilişkili olmadığı görülmüştür.

8. ABSTRACT

The DNA repair gene Ku70, an important member of non-homologous end-joining repair system, is thought to play an important role in the repairing of DNA double strand breaks. It is known that defects in double strand break repair capacity can lead to irreversible genomic instability. However, the polymorphic variants of Ku70, have never been reported about their association with gastric cancer susceptibility.

In this hospital-based case-control study, the associations of Ku70 promoter G-57C (rs2267437) and intron 3 (rs132774) polymorphisms with gastric cancer risk in Turkish population were investigated. In total, 92 patients with gastric cancer and 194 age- and gender-matched healthy controls recruited from the Dokuz Eylül University Hospital in İzmir were genotyped by real time PCR method.

As for two polymorphisms, there was no difference between both groups in the distributions of their genotype frequencies.

In conclusion, the Ku70 promoter C-57G (rs2267437) and intron 3 (rs132774), is not associated with gastric cancer susceptibility.

9. KAYNAKLAR

1. Forman D, Plummer M. Gastric cancer: epidemiology and risk factors. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2013 Jun;42(2):219-40.
2. Shanks AM, El-Omar EM. Helicobacter pylori infection, host genetics and gastric cancer. *Journal of Digestive Diseases*. 2009 Aug;10(3):157-64.
3. El-Omar EM, Chow WH, Rabkin CS. Gastric cancer and H. pylori: Host genetics open the way. *Gastroenterology*. 2001 Oct;121(4):1002-4.
4. Su S, Yao Y, Zhu R, Liang C, Jiang S, Hu N, et al. The Associations between single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes, DNA damage, and age-related ataract: Jiangsu Eye Study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013;54(2):1201-7.
5. McKean-Cowdin R, Barnholtz-Sloan J, Inskip PD, Ruder AM, Butler M, Rajaraman P, et al. Associations between polymorphisms in DNA repair genes and glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2009 Apr;18(4):1118-26.
6. Yang MD, Wang HC, Chang WS, Tsai CW, Bau DT. Genetic polymorphisms of DNA double strand break gene Ku70 and gastric cancer in Taiwan. *BMC Cancer*. 2011;11:174. PubMed PMID: 21575261.
7. Imyanitov E, Hanson K, Zhivotovsky B. Polymorphic variations in apoptotic genes and cancer predisposition. *Cell Death and Differentiation*. 2005 Aug;12(8):1004-7.
8. Bruce Alberts AJ. *Molecular Biology of the Cell*. 2007 (Fifth Edition):1205-67.
9. Romanowicz-Makowska H, Smolarz B, Kulig A. Polymorphisms in XRCC1 and ERCC4/XPF DNA repair genes and associations with breast cancer risk in women. 2007 Mar;22(129):200-3.
10. Xing D, Qi J, Miao X, Lu W, Tan W, Lin D. Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XPD and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *International Journal of Cancer* 2002 Aug 10;100(5):600-5.
11. Willems P, De Ruyck K, Van den Broecke R, Makar A, Perletti G, Thierens H, et al. A polymorphism in the promoter region of Ku70/XRCC6, associated with breast cancer risk and oestrogen exposure. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2009 Sep;135(9):1159-68.
12. He W, Luo S, Huang T, Ren J, Wu X, Shao J, et al. The Ku70 -1310C/G promoter polymorphism is associated with breast cancer susceptibility in Chinese Han population. *Molecular Biology Reports*. 2012 Jan;39(1):577-83.
13. Chang CH, Chang CL, Tsai CW, Wu HC, Chiu CF, Wang RF, et al. Significant association of an XRCC4 single nucleotide polymorphism with bladder cancer susceptibility in Taiwan. *Anticancer Research*. 2009 May;29(5):1777-82.

14. Han J, Colditz GA, Samson LD, Hunter DJ. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and skin cancer risk. *Cancer Research*. 2004 May 1;64(9):3009-13.
15. Chiu CF, Tsai MH, Tseng HC, Wang CL, Wang CH, Wu CN, et al. A novel single nucleotide polymorphism in XRCC4 gene is associated with oral cancer susceptibility in Taiwanese patients. *Oral Oncology*. 2008 Sep;44(9):898-902.
16. Bau DT, Tseng HC, Wang CH, Chiu CF, Hua CH, Wu CN, et al. Oral cancer and genetic polymorphism of DNA double strand break gene Ku70 in Taiwan. *Oral Oncology*. 2008 Nov;44(11):1047-51.
17. Chiu CF, Wang CH, Wang CL, Lin CC, Hsu NY, Weng JR, et al. A novel single nucleotide polymorphism in XRCC4 gene is associated with gastric cancer susceptibility in Taiwan. *Annals of Surgical Oncology*. 2008 Feb;15(2):514-8.
18. Gray H. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 40 ed November 21, 2008:1317-1321
19. Keith L. Moore TVNP. *Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects* 8ed. 2012:137-138 p.
20. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 2001 Jan-Feb;51(1):15-36.
21. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *The Lancet Oncology*. 2001 Sep;2(9):533-43.
22. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 2002 Jan-Feb;52(1):23-47.
23. Yamamoto S. Cancer statistics Digest. Trends of all cancer in Japan [News]. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2001 Jun;31(6):294-6.
24. Le GM, Gomez SL, Clarke CA, Glaser SL, West DW. Cancer incidence patterns among Vietnamese in the United States and Ha Noi, Vietnam. *International Journal of Cancer*. 2002 Dec 1;102(4):412-7.
25. Amundadottir LT, Thorvaldsson S, Gudbjartsson DF, Sulem P, Kristjansson K, Arnason S, et al. Cancer as a complex phenotype: Pattern of cancer distribution within and beyond the nuclear family. *PLoS Medicine*. 2004 Dec;1(3):229-36.
26. <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?hgid=337654163&hgt.psOutput=on>.
27. Parkin DM, Muir CS. *Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and Quality of Data*. IARC Scientific Publications. 1992 (120):45-173.
28. Sipponen P, Correa P. Delayed rise in incidence of gastric cancer in females results in unique sex ratio (M/F) pattern: etiologic hypothesis. *Gastric Cancer*. 2002;5(4):213-9.

29. Col C, Hasdemir O, Yalcin E, Yandakci K, Tunc G, Kucukpinar T. Sexual dysfunction after curative radical resection of rectal cancer in men: the role of extended systematic lymph-node dissection. *Medical Science Monitor*. 2006 Feb;12(2):CR70-4.
30. Parkin DM, Iscovich J. Risk of cancer in migrants and their descendants in Israel: II. Carcinomas and germ-cell tumours. *International Journal of Cancer*. 1997 Mar 17;70(6):654-60.
31. Christie J, Shepherd NA, Codling BW, Valori RM. Gastric cancer below the age of 55: implications for screening patients with uncomplicated dyspepsia. *Gut*. 1997 Oct;41(4):513-7.
32. Baker MT, Lara MD, Larson CJ, Lambert PJ, Mathiason MA, Kothari SN. Length of stay and impact on readmission rates after laparoscopic gastric bypass. *Surgery for Obesity and Related Diseases*. 2006 Jul-Aug;2(4):435-9.
33. Shibata A, Longacre TA, Puligandla B, Parsonnet J, Habel LA. Histological classification of gastric adenocarcinoma for epidemiological research: concordance between pathologists. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2001 Jan;10(1):75-8.
34. Henning GT, Schild SE, Stafford SL, Donohue JH, Burch PA, Haddock MG, et al. Results of irradiation or chemoradiation for primary unresectable, locally recurrent, or grossly incomplete resection of gastric adenocarcinoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 2000 Jan 1;46(1):109-18.
35. Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *Journal of Clinical Epidemiology*. 2003 Jan;56(1):1-9.
36. Correa P. Clinical implications of recent developments in gastric cancer pathology and epidemiology. *Seminars in Oncology*. 1985 Mar;12(1):2-10.
37. Torres J, Correa P, Ferreccio C, Hernandez-Suarez G, Herrero R, Cavazza-Porro M, et al. Gastric cancer incidence and mortality is associated with altitude in the mountainous regions of Pacific Latin America. *Cancer Causes & Control*. 2013 Feb;24(2):249-56.
38. Jass JR, Sobin LH, Watanabe H. The World Health Organization's histologic classification of gastrointestinal tumors. A commentary on the second edition. *Cancer*. 1990 Nov 15;66(10):2162-7.
39. Washington K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Annals of Surgical Oncology*. 2010 Dec;17(12):3077-9.
40. Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of malignant tumors. Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer*. 1997 Nov 1;80(9):1803-4.
41. You WC, Zhang L, Gail MH, Chang YS, Liu WD, Ma JL, et al. Gastric dysplasia and gastric cancer: Helicobacter pylori, serum vitamin C, and other risk factors. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000 Oct 4;92(19):1607-12.
42. Demirel T, Icli F, Uzunalimoglu O, Kucuk O. Diet and stomach cancer incidence. A case-control study in Turkey. *Cancer*. 1990 May 15;65(10):2344-8.

43. Berretta M, Cappellani A, Lleshi A, Di Vita M, Lo Menzo E, Bearz A, et al. The role of diet in gastric cancer: still an open question. *Frontiers in Bioscience*. 2012;17:1640-7.
44. Guggenheim DE, Shah MA. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *Journal of Surgical Oncology*. 2013 Mar;107(3):230-6.
45. Bonequi P, Meneses-Gonzalez F, Correa P, Rabkin CS, Camargo MC. Risk factors for gastric cancer in Latin America: a meta-analysis. *Cancer Causes & Control*. 2013 Feb;24(2):217-31.
46. Kim YJ, Chung JW, Lee SJ, Choi KS, Kim JH, Hahm KB. Progression from chronic atrophic gastritis to gastric cancer; tangle, toggle, tackle with Korea red ginseng. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2010 May;46(3):195-204.
47. Mizuno S, Miki I, Ishida T, Yoshida M, Onoyama M, Azuma T, et al. Prescreening of a high-risk group for gastric cancer by serologically determined *Helicobacter pylori* infection and atrophic gastritis. *Digestive Diseases and Sciences*. 2010 Nov;55(11):3132-7.
48. Seruca R, Castedo S, Correia C, Carneiro F, Soares P, et al. Cytogenetic findings in eleven gastric carcinomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1993 Jul 1;68(1):42-8.
49. Panani AD, Ferti A, Malliaros S, Raptis S. Cytogenetic study of 11 gastric adenocarcinomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1995 Jun;81(2):169-72.
50. Byun DS, Cho K, Ryu BK, Lee MG, Kang MJ, Kim HR, et al. Hypermethylation of XIAP-associated factor 1, a putative tumor suppressor gene from the 17p13.2 locus, in human gastric adenocarcinomas. *Cancer Research*. 2003 Nov 1;63(21):7068-75.
51. Hong SH, Kim HG, Chung WB, Kim EY, Lee JY, Yoon SM, et al. DNA hypermethylation of tumor-related genes in gastric carcinoma. *Journal of Korean Medical Science*. 2005 Apr;20(2):236-41.
52. Shimada Y, Yamasaki S, Hashimoto Y, Ito T, Kawamura J, Soma T, et al. Clinical significance of dysadherin expression in gastric cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 2004 Apr 15;10(8):2818-23.
53. Da MX, Wu XT, Guo TK, Zhao ZG, Luo T, Qian K, et al. Clinical significance of telomerase activity in peritoneal lavage fluid from patients with gastric cancer and its relationship with cellular proliferation. *World Journal of Gastroenterology*. 2007 Jun 14;13(22):3122-7.
54. Kang Y, Zhang J, Sun P, Shang J. Circulating cell-free human telomerase reverse transcriptase mRNA in plasma and its potential diagnostic and prognostic value for gastric cancer. *International Journal of Clinical Oncology / Japan Society of Clinical Oncology*. 2012 Apr 12.
55. Ito H, Inoue H, Sando N, Kimura S, Gohda K, Sato J, et al. Prognostic impact of detecting viable circulating tumour cells in gastric cancer patients using a telomerase-specific viral agent: a prospective study. *BMC Cancer*. 2012;12:346.

56. Miyoshi E, Haruma K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Shimamoto F, et al. Microsatellite instability is a genetic marker for the development of multiple gastric cancers. *International Journal of Cancer*. 2001 Nov 20;95(6):350-3.
57. Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Ito M, Masuda H, Miyamoto M, et al. Microsatellite instability at D18S61 is associated with no regression of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication. *Oncology Reports*. 2001 Mar-Apr;8(2):293-7.
58. Yang XY, Wang MW, Wang GS, You WD. [Expression of human anti-apoptotic gene survivin and its splice in normal human gastric tissue and gastric cancer]. *Chinese Journal of Medical Genetics*. 2003 Feb;20(1):75-6.
59. Werner M, Becker KF, Keller G, Hofler H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2001 Apr;127(4):207-16.
60. Ebert MP, Malfertheiner P. Review article: Pathogenesis of sporadic and familial gastric cancer--implications for clinical management and cancer prevention. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2002 Jun;16(6):1059-66.
61. Zhang JF, Zhang JG, Kuai XL, Zhang H, Jiang W, Ding WF, et al. Reactivation of the homeotic tumor suppressor gene CDX2 by 5-aza-2'-deoxycytidine-induced demethylation inhibits cell proliferation and induces caspase-independent apoptosis in gastric cancer cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2013 Mar;5(3):735-41.
62. Knudson E. [On education]. *Sykepleien*. 1971 Dec 15;58(24):865. PubMed PMID: 5211875.
63. Ueo H, Matsuoka H, Tamura S, Sato K, Tsunematsu Y, Kato T. Prognosis in gastric cancer associated with pregnancy. *World Journal of Surgery*. 1991 Mar-Apr;15(2):293-7, discussion 8.
64. Dhar DK, Wang TC, Maruyama R, Udagawa J, Kubota H, Fuji T, et al. Expression of cytoplasmic TFF2 is a marker of tumor metastasis and negative prognostic factor in gastric cancer. Laboratory investigation; a *Journal of Technical Methods and Pathology*. 2003 Sep;83(9):1343-52.
65. Uchino S, Tsuda H, Noguchi M, Yokota J, Terada M, Saito T, et al. Frequent loss of heterozygosity at the DCC locus in gastric cancer. *Cancer Research*. 1992 Jun 1;52(11):3099-102.
66. Sud R, Wells D, Talbot IC, Delhanty JD. Genetic alterations in gastric cancers from British patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2001 Apr 15;126(2):111-9.
67. Zhang Z. The risk of gastric cancer in patients with duodenal and gastric ulcer: research progresses and clinical implications. *Journal of Gastrointestinal Cancer*. 2007;38(1):38-45.

68. Corso G, Carvalho J, Marrelli D, Vindigni C, Carvalho B, Seruca R, et al. Somatic mutations and deletions of the e-cadherin gene predict poor survival of patients with gastric cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2013 Mar 1;31(7):868-75.
69. Bohr VA. DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. *Carcinogenesis*. 1995 Dec;16(12):2885-92.
70. Oliveira C, Sousa S, Pinheiro H, Karam R, Bordeira-Carrico R, Senz J, et al. Quantification of epigenetic and genetic 2nd hits in CDH1 during hereditary diffuse gastric cancer syndrome progression. *Gastroenterology*. 2009 Jun;136(7):2137-48.
71. Sato K, Tamura G, Tsuchiya T, Endoh Y, Sakata K, Motoyama T, et al. Analysis of genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in gastric cancer. *Virchows Archiv : an International Journal of Pathology*. 2002 Feb;440(2):160-5.
72. Tamura G. Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in gastric cancer. *Histology and Histopathology*. 2002 Jan;17(1):323-9.
73. Furgason JM, Bahassi el M. Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013 Mar;137(3):298-308.
74. Mondal P, Datta S, Maiti GP, Baral A, Jha GN, Panda CK, et al. Comprehensive SNP scan of DNA repair and DNA damage response genes reveal multiple susceptibility loci conferring risk to tobacco associated leukoplakia and oral cancer. *PloS One*. 2013;8(2):e56952.
75. Damia G, D'Incalci M. Targeting DNA repair as a promising approach in cancer therapy. *European Journal of Cancer*. 2007 Aug;43(12):1791-801.
76. Couve-Privat S, Bouadjar B, Avril MF, Sarasin A, Daya-Grosjean L. Significantly high levels of ultraviolet-specific mutations in the smoothed gene in basal cell carcinomas from DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Research*. 2002 Dec 15;62(24):7186-9.
77. Lehmann AR. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie*. 2003 Nov;85(11):1101-11.
78. Arnaudeau-Begard C, Brellier F, Chevallier-Lagente O, Hoeijmakers J, Bernerd F, Sarasin A, et al. Genetic correction of DNA repair-deficient/cancer-prone xeroderma pigmentosum group C keratinocytes. *Human Gene Therapy*. 2003 Jul 1;14(10):983-96.
79. Kutuzov MM, Khodyreva SN, Ame JC, Iliina ES, Sukhanova MV, Schreiber V, et al. Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins. *Biochimie*. 2013 Jan 26.
80. Maria Berra C, Santos de Oliveira C, Carriao Machado Garcia C, Ribeiro Reily Rocha C, Koch Lerner L, Carmo de Andrade Lima L, et al. Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue. *Free Radical Biology & Medicine*. 2013 Apr 5.

81. Hardy PO, Chaconas G. The nucleotide excision repair system of *B. burgdorferi* is the sole pathway involved in repair of DNA damage by UV light. *Journal of Bacteriology*. 2013 Mar 8.
82. Budden T, Bowden NA. The Role of Altered Nucleotide Excision Repair and UVB-Induced DNA Damage in Melanomagenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(1):1132-51.
83. Omori S, Takiguchi Y, Suda A, Sugimoto T, Miyazawa H, Takiguchi Y, et al. Suppression of a DNA double-strand break repair gene, Ku70, increases radio- and chemosensitivity in a human lung carcinoma cell line. *DNA Repair*. 2002 Apr 29;1(4):299-310.
84. Rusin P, Walczak A, Zwierzchlejska A, Olszewski J, Morawiec-Bajda A, Kaczmarczyk D, et al. DNA damage and repair of head and neck cancer cells after radio- and chemotherapy. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of Biosciences*. 2009 Jul-Aug;64(7-8):601-10.
85. Ivannik BP, Proskuriakov S, Golubeva Golubeva RV, Riabchenko NI. [DNA degradation and repair in radio-sensitive tissues of irradiated rats]. *Radiobiologia*. 1976 Nov-Dec;16(6):803-9.
86. McKinney JS, Sethi S, Tripp JD, Nguyen TN, Sanderson BA, Westmoreland JW, et al. A multistep genomic screen identifies new genes required for repair of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. 2013 Apr 15;14(1):251.
87. Ghodke I, Muniyappa K. Processing of DNA double-strand breaks and intermediates of recombination and repair by *Saccharomyces cerevisiae* Mre11 and its stimulation by Rad50, Xrs2 and Sae2 proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013 Feb 26.
88. Dehennaut V, Loison I, Dubuissez M, Nassour J, Abbadie C, Leprince D. DNA Double-strand Breaks Lead to Activation of Hypermethylated in Cancer 1 (HIC1) by SUMOylation to Regulate DNA Repair. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013 Apr 12;288(15):10254-64.
89. Hagen U. Mechanisms of induction and repair of DNA double-strand breaks by ionizing radiation: some contradictions. *Radiation and Environmental Biophysics*. 1994;33(1):45-61.
90. Taleei R, Nikjoo H. The Non-homologous End-Joining (NHEJ) Pathway for the Repair of DNA Double-Strand Breaks: I. A Mathematical Model. *Radiation Research*. 2013 Apr 5.
91. Fujita M, Sasanuma H, Yamamoto KN, Harada H, Kurosawa A, Adachi N, et al. Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks. *PloS One*. 2013;8(4):e60043.
92. Prodosmo A, De Amicis A, Nistico C, Gabriele M, Di Rocco G, Monteonofrio L, et al. p53 centrosomal localization diagnoses ataxia-telangiectasia homozygotes and heterozygotes. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013 Mar 1;123(3):1335-42.
93. Lawrence J, Karpuzoglu E, Vance A, Vandenplas M, Saba C, Turek M, et al. Changes in gamma-H2AX expression in irradiated feline sarcoma cells: An indicator of double strand DNA breaks. *Research in Veterinary Science*. 2013 Jun;94(3):545-8.

94. Kuefner MA, Brand M, Engert C, Kappey H, Uder M, Distel LV. The effect of calyculin A on the dephosphorylation of the histone gamma-H2AX after formation of X-ray-induced DNA double-strand breaks in human blood lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*. 2013 Feb 19.
95. Foster ER, Downs JA. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *The FEBS Journal*. 2005 Jul;272(13):3231-40.
96. Ismail IH, Hendzel MJ. The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2008 Jan;49(1):73-82.
97. Somyajit K, Basavaraju S, Scully R, Nagaraju G. ATM- and ATR-Mediated Phosphorylation of XRCC3 Regulates DNA Double-Strand Break-Induced Checkpoint Activation and Repair. *Molecular and Cellular Biology*. 2013 May;33(9):1830-44.
98. Cuadrado M, Martinez-Pastor B, Murga M, Toledo LI, Gutierrez-Martinez P, Lopez E, et al. ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of Experimental Medicine*. 2006 Feb 20;203(2):297-303.
99. Tomimatsu N, Tahimic CG, Otsuki A, Burma S, Fukuhara A, Sato K, et al. Ku70/80 modulates ATM and ATR signaling pathways in response to DNA double strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007 Apr 6;282(14):10138-45.
100. Peter D Turnpenny BSc MB ChB FRCP FRCPC SEB. *Emery's Elements of Medical Genetics*. 14th ed. 2011: 27-41
101. Fernandez-Capetillo AJL-CaO. Protein phosphorylation in human health. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* . 2012 Sept 6; under CC BY 3.0 license.
102. Bennardo N, Cheng A, Huang N, Stark JM. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genetics*. 2008 Jun;4(6):e1000110.
103. Salles B, Calsou P, Frit P, Muller C. The DNA repair complex DNA-PK, a pharmacological target in cancer chemotherapy and radiotherapy. *Pathologie-Biologie*. 2006 May;54(4):185-93.
104. Daniel L. Hartl MR. *Genetics- Analysis of Genes And Genomes*. Sixth Edition. 2005:642-685
105. Mazina OM, Rossi MJ, Deakyne JS, Huang F, Mazin AV. Polarity and bypass of DNA heterology during branch migration of Holliday junctions by human RAD54, BLM, and RECQ1 proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012 Apr 6;287(15):11820-32.
106. Wechsler T, Newman S, West SC. Aberrant chromosome morphology in human cells defective for Holliday junction resolution. *Nature*. 2011 Mar 31;471(7340):642-6.
107. Zou H, Rothstein R. Holliday junctions accumulate in replication mutants via a RecA homolog-independent mechanism. *Cell*. 1997 Jul 11;90(1):87-96.

108. Pereira AR, Reed P, Veiga H, Pinho MG. The Holliday junction resolvase RecU is required for chromosome segregation and DNA damage repair in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*. 2013;13:18.
109. Nie Y, Liu H, Sun X. The patterns of histone modifications in the vicinity of transcription factor binding sites in human lymphoblastoid cell lines. *PLoS One*. 2013;8(3):e60002.
110. Burgess RJ, Zhang Z. Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2013 Jan;20(1):14-22.
111. Flaus A, Owen-Hughes T. Mechanisms for nucleosome mobilization. *Biopolymers*. 2003 Apr;68(4):563-78.
112. Ye J, Wu Y, Gilson E. Dynamics of telomeric chromatin at the crossroads of aging and cancer. *Essays in Biochemistry*. 2010 Sep 20;48(1):147-64.
113. Rosenberg M, Fan AX, Lin IJ, Liang SY, Bungert J. Cell-cycle specific association of transcription factors and RNA polymerase II with the human beta-globin gene locus. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013 Mar 20.
114. Deng B, Melnik S, Cook PR. Transcription factories, chromatin loops, and the dysregulation of gene expression in malignancy. *Seminars in Cancer Biology*. 2013 Apr;23(2):65-71.
115. Sims RJ, 3rd, Reinberg D. From chromatin to cancer: a new histone lysine methyltransferase enters the mix. *Nature Cell Biology*. 2004 Aug;6(8):685-7.
116. Hong CP, Choe MK, Roh TY. Characterization of Chromatin Structure-associated Histone Modifications in Breast Cancer Cells. *Genomics & Informatics*. 2012 Sep;10(3):145-52.
117. Wang GG, Allis CD, Chi P. Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends in Molecular Medicine*. 2007 Sep;13(9):363-72.
118. Canbay E, Kahraman OT, Bugra D, Caykara B, Seyhan MF, Bulut T, et al. Increased Gastric Cancer Risk with PTEN IVS4 Polymorphism in a Turkish Population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2013 Mar;17(3):249-53.
119. Gao L, Nieters A, Brenner H. Cell proliferation-related genetic polymorphisms and gastric cancer risk: systematic review and meta-analysis. *European Journal of Human Genetics*. 2009 Dec;17(12):1658-67.
120. Xue H, Ni P, Lin B, Xu H, Huang G. X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) genetic polymorphisms and gastric cancer risk: A HuGE review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*. 2011 Feb 15;173(4):363-75.
121. Gianfagna F, De Feo E, van Duijn CM, Ricciardi G, Boccia S. A systematic review of meta-analyses on gene polymorphisms and gastric cancer risk. *Current Genomics*. 2008 Sep;9(6):361-74.

122. Boccia S, Hung R, Ricciardi G, Gianfagna F, Ebert MP, Fang JY, et al. Meta- and pooled analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and gastric cancer risk: a huge-GSEC review. *American Journal of Epidemiology*. 2008 Mar 1;167(5):505-16.
123. Pierce AJ, Hu P, Han M, Ellis N, Jasin M. Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes & Development*. 2001 Dec 15;15(24):3237-42.
124. Thacker J, Zdzienicka MZ. The XRCC genes: expanding roles in DNA double-strand break repair. *DNA Repair*. 2004 Aug-Sep;3(8-9):1081-90.
125. Drouet J, Frit P, Delteil C, de Villartay JP, Salles B, Calsou P. Interplay between Ku, Artemis, and the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit at DNA ends. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006 Sep 22;281(38):27784-93.
126. Jones JM, Gellert M, Yang W. A Ku bridge over broken DNA. *Structure*. 2001 Oct;9(10):881-4.
127. Cahill D, Connor B, Carney JP. Mechanisms of eukaryotic DNA double strand break repair. *Frontiers in Bioscience*. 2006;11:1958-76.
128. Ku (protein). Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/Ku_\(protein\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Ku_(protein)).
129. Gullo C, Au M, Feng G, Teoh G. The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006 Apr;1765(2):223-34.
130. Korabiowska M, Quentin T, Schlott T, Bauer H, Kunze E. Down-regulation of Ku 70 and Ku 80 mRNA expression in transitional cell carcinomas of the urinary bladder related to tumor progression. *World Journal of Urology*. 2004 Dec;22(6):431-40.
131. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/XRCC6ID246ch22q13.html>.
132. Mackay J. Introduction to kinetic (real-time) PCR. *Methods in Molecular Biology*. 2007;353:167-76.
133. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*. 2003 Oct 13;3:18.
134. Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, et al. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol*. 2006 Apr;44(4):1405-12.
135. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001 May 1;29(9):e45.
136. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988 Feb 11;16(3):1215.

137. Schikorski D, Renault T, Paillard C, Bidault-Toffin A, Tourbiez D, Saulnier D. Development of TaqMan real-time PCR assays for monitoring *Vibrio harveyi* infection and a plasmid harbored by virulent strains in European abalone *Haliotis tuberculata* aquaculture. *Aquaculture*. 2013 May 10;392:106-12.
138. Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V. Epidemiology of stomach cancer. *Methods in Molecular Biology*. 2009;472:467-77.
139. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *European Journal of Cancer*. 2002 Jan;38(1):99-166.
140. Demir G ÜD, Zengin N, Er Ö, Dane F, Yalçın Ş. Opere 840 mide kanserli hastada prognostik faktörler. TOG. Gastrointestinal Tümörler Grubu Çalışması. Medical Oncology Congress, Antalya; 2008, (abstr SB15). 2008.
141. Krajinovic M, Labuda D, Mathonnet G, Labuda M, Moghrabi A, Champagne J, et al. Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2002 Mar;8(3):802-10.
142. Skorokhod OM, Kravchuk IV, Teleheiev HD, Maliuta SS. [Role of Ku protein in normal and cancer cells]. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*. 2006 Sep-Oct;78(5):5-15.
143. Xu L, Ju XB, Li P, Wang J, Shi ZM, Zheng MJ, et al. Association between the Ku70-1310C/G promoter polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*. 2012;13(2):683-7.
144. Yaneva M, Arnett FC. Antibodies against Ku protein in sera from patients with autoimmune diseases. *Clinical and Experimental Immunology*. 1989 Jun;76(3):366-72.

10. EKLER

10.1.Ek 1 Gönüllü Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Mide kanseri hastalığının oluşumu ve ilerleyişinde DNA tamir genlerinin etkileri konulu yeni bir araştırma yapmayı planladık. Araştırmanın ismi " Mide tümörlü hastalarda Ku70 gen polimorfizmlerinin etkisi " dir.

Mide kanserinin çok çeşitli nedenleri mevcuttur ve son yıllarda genetik bir yatkınlığın olduğuyla ilgili yayınlar vardır. Ku70 geni DNA tamirinden sorumlu bir gendir ve kansere yatkınlıkta, bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıklarda etkin olduğuna dair yayınlar vardır. Ku70 genindeki değişimlerin çevresel faktörlerin de etkisiyle kanser gelişiminde rolü olduğu düşünülmektedir.

Sizin de bu araştırmaya kontrol grubu olarak katılmanızı öneriyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmanın Adı: Mide kanserli hastalarda Ku70 gen polimorfizmlerinin etkisi

Sorumlu Araştırmacılar: Yard. Doç. Dr. Elçin Bora, Prof. Dr. M. Derya Erçal, Prof Dr. Seymen Bora, Prof. Dr. Ayfer Ülgenalp, Doç. Dr. Koray Atila, Prof. Dr. Özgül Sağol, Uz. Dr. Tufan Çankaya, Araş. Gör. Dr. Sezin Canbek

Araştırmanın Yürütüleceği Klinik: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni sizde bu hastalığın bulunması veya kontrol grubu olarak yapılacak incelemeye katılımınızın istenmesidir. Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz tetkikleriniz eşliğinde değerlendirmeniz sonrasında 8 ml. kadar kan almamız gerekmektedir. Alacağımız kandan elde ettiğimiz DNA'dan genetik testler yapacağız . DNA elde etmekte teknik sorun olursa bir kez daha kan vermeniz istenebilir. Aynı DNA'nız ileride durumunuzla ilişkili başka gen çalışmalarında veya kontrol grubu olarak da kullanılabilir. Araştırma giderleri size veya sosyal güvenlik kurumunuza yüklenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır. Genetik testlerin sonucu kişilere bir rapor olarak verilmeyecektir. Çalışmanın sonucu **Kişi ismi kullanılmadan** bilimsel dergi ve platformlarda yayınlanabilecektir.

Yapılacak araştırmanın getireceği olası yararlar: Planladığımız analiz sonuçlarının mide kanseri hastalığının oluşumu ve ilerlemesindeki genetik etkilerin öğrenilmesinde yararlı olabileceğini öngörmektediriz. Şu anda bu çalışmanın hemen size bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak ilgili hastalığın temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi tedavide yeni yaklaşımlar getirebilecek ve ilgili hastalıktan etkilenmiş bireylere fayda sağlayabilecektir. Bir sonuç ortaya çıktığında ve klinik yarara dönüştüğü takdirde bu yarar mide kanseri olanlarda hastalığın gidişatı konusunda yol gösterici olabilir.

Kan alımı sırasında çok az bir acı hissedilebilir; kan alma bölgesinde morarma çok nadiren de pıhtı ve enfeksiyon olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızca alınacaktır. Kontrol grubunda iseniz başka bir nedenle tetkik için kan vermeniz gerektiği sırada alınacak kan örneğinden bu çalışma için gerekli DNA eldesi yapılacak; zaten yaptırmak zorunda olduğunuz kan alımı dışında ekstra bir kan alımı yapılmayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın *herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da* sahipsiniz.

Ayrıca tıbbi durumunuza herhangi bir zarar verilmeden araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirsiniz.

Bu çalışmayla ilişkili sağlık kaydınız kurumumuzun yerel Etik Kurul Komitesi ve Sağlık Bakanlığı haricinde kesinlikle gizli kalacaktır. Çalışma sonuçları bir yayın veya sunumda kullanılırken *kesinlikle isminiz kullanılmayacaktır*.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarda söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla , hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Tarih: / / 20

Katılımcı

Adı / Soyadı:

Tel:

İmza

Görüşme tanığı

Adı / Soyadı:

Tel:

İmza

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı / Soyadı:

Tel:

İmza