

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI**

**GASTROİNTESTİNAL SİSTEM ADENOKARSİNOM
ÖRNEKLERİNDE P53 KODON 72 POLİMORFİZMİ
VE İNSAN PAPİLLOMA VİRÜS (HPV) ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

DENİZ EROL

ELAZIĞ – 2007

ONAY SAYFASI

.....
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

..... **Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

| | |
|-------|-------|
| | _____ |
| | _____ |
| | _____ |
| | _____ |
| | _____ |

TEŞEKKÜR

Araştırma görevlisi olarak çalıştığım sürede eğitimime olan katkıları ve tez hazırlığı sırasında yardımları nedeniyle danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Hüseyin YÜCE'ye, yönlendirmeleri için Prof. Dr. Halit ELYAS'a, tez ikinci danışman hocam Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Yasemin BULUT'a, tezimin Patoloji Anabilim Dalı'ndaki bölümleri için yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. İbrahim ÖZERCAN'a, istatistiki değerlendirmeler konusunda yardımlarını esirgemeyen Veteriner Fakültesi öğretim üyelerinden Doç. Dr. İbrahim ŞEKER'e, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. İbrahim TEKEDERELİ'ye, ihtiyaç duyduğumda yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen bölüm arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Gülay Güleç CEYLAN'a, Arş. Gör. Ebru Etem'e, Arş. Gör. Derya DEVECİ'ye, Arş. Gör. Dr. Murat KARA'ya, bölüm sekreteri Mehmet SATILMIŞ'a, kat görevlisi Mehmet GİRİŞ'e ve doktora çalışmam boyunca bana destek veren aileme teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Ayrıca bu çalışmayı 1198 nolu proje kapsamında destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Birimine teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa No |
|---|----------|
| 1. ÖZET | 1 |
| 2. ABSTRACT | 2 |
| 3. GİRİŞ | 3 |
| 3.1. Kanserın Genetik Temeli | 3 |
| 3.1.1. Kanserde Rol Oynayan Genler | 5 |
| 3.1.1.1. Onkogenler | 5 |
| 3.1.1.2. Tümör Supressör Genler | 6 |
| 3.1.2. Hücre Siklusunun Kontrolü | 7 |
| 3.2. Genetik Varyasyon ve Polimorfizm..... | 8 |
| 3.3. p53 Geni | 9 |
| 3.3.1. p53 Genindeki Polimorfizmler | 12 |
| 3.3.1.1. p53'ün kodlayıcı-olmayan bölgelerindeki polimorfizmler | 12 |
| 3.3.1.2. p53 proteininin kodlayıcı dizisini değiştiren polimorfizmler | 13 |
| 3.4. p53 Kodon 72 Polimorfizmi ve Kanser Yatkınlığı Arasındaki İlişki | 14 |
| 3.5. İnsan Papillomavirüsü (HPV) | 17 |
| 3.5.1. HPV Yapısı ve Genomu | 18 |
| 3.5.2. HPV Onkoproteinleri | 21 |
| 3.5.3. HPV'nin Transformasyon Mekanizmaları ve İnsan Kanserlerindeki Rolü ... | 24 |
| 3.6. İnsan Kanserlerinde HPV ve p53 Kodon 72 Polimorfizmi Arasındaki İlişki ... | 28 |
| 3.7. Çalışmanın Amacı | 29 |
| 4. GEREÇ ve YÖNTEM | 33 |
| 4.1. Hastaların Seçimi | 33 |

| | |
|---|----|
| 4.2. Örneklerin toplanması ve analize hazırlanması | 34 |
| 4.3. Kimyasal maddeler, sarf malzemeleri ve cihazlar | 35 |
| 4.4. Parafin blok kesitlerinden DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonların hazırlanması | 36 |
| 4.4.1 K tamponunun hazırlanması | 36 |
| 4.4.2. DTT'nin hazırlanması | 37 |
| 4.4.3. Sodyum asetat'ın hazırlanması | 37 |
| 4.5. Parafin blok kesitlerinden DNA izolasyonu | 37 |
| 4.6. Kandan DNA izolasyonu | 39 |
| 4.7. Oligonükleotidler (primerler) | 39 |
| 4.8. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) | 40 |
| 4.8.1. Beta globin spesifik PCR | 40 |
| 4.8.2. p53 kodon 72 spesifik PCR | 41 |
| 4.8.3. HPV spesifik PCR | 42 |
| 4.9. Agaroz jel elektroforezi | 44 |
| 4.10. İstatistiksel analizler | 45 |
| 5. BULGULAR | 46 |
| 5.1. Parafin Blok Kesitlerinde Beta-Globin PCR sonuçları | 46 |
| 5.2. Hasta ve Kontrollerde p53 Kodon 72 Polimorfizminin Dağılımı | 47 |
| 5.3. Hasta ve Kontrol Grubunda Cinsiyete Göre p53 Kodon 72 Polimorfizminin Dağılımı | 50 |
| 5.4. Hasta ve Kontrol Grubunda Yaşa Göre p53 Kodon 72 Polimorfizminin Dağılımı | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 5.5. Hasta Grubunda Tümör Lokalizasyonuna Göre p53 Kodon 72 Polimorfizminin Dağılımı | 52 |
| 5.6. Hasta Grubunda Tümörün Histolojik Tipine Göre p53 Kodon 72 Polimorfizminin Dağılımı | 52 |
| 5.7. Hasta grubunda tümör dokusu ve tümöre komşu normal dokuda gözlenen HPV | 53 |
| 5.8. Hasta grubunda HPV pozitifliği ve p53 kodon 72 polimorfizmi | 57 |
| 6. TARTIŞMA | 58 |
| 6.1. Hasta ve Kontrol Grubunda p53 Kodon 72 Polimorfizminin Değerlendirilmesi | 58 |
| 6.2. Hasta ve Kontrol Grubunda Tespit Edilen HPV'nin Değerlendirilmesi | 66 |
| 6.3. HPV pozitifliği ve p53 Kodon 72 Polimorfizminin Değerlendirilmesi | 72 |
| 6.4. Öneriler | 76 |
| 7. KAYNAKLAR | 79 |
| 8. ÖZGEÇMİŞ | 86 |

TABLolar LİSTESİ

| | Sayfa No |
|---|----------|
| Tablo 1 : Hastalarda tümör lokalizasyonuna göre tümörün histolojik tipleri..... | 34 |
| Tablo 2 : Kullanılan primerlerin dizileri ve PCR ürün uzunlukları..... | 40 |
| Tablo 3 : Hasta ve kontrol grubundaki p53 kodon 72 polimorfizmine ait genotip sıklıkları | 48 |
| Tablo 4 : Hasta ve kontrol grubundaki p53 kodon 72 polimorfizmine ait Arg ve Pro allel frekansları | 49 |
| Tablo 5: Cinsiyete göre hasta ve kontrol grubunda p53 genotipinin dağılımı . | 50 |
| Tablo 6: Yaşa göre hasta ve kontrol grubunda p53 genotipinin dağılımı | 51 |
| Tablo 7: Hasta grubunda tümör lokalizasyonuna göre p53 genotipinin dağılımı | 52 |
| Tablo 8: Hasta grubunda tümörün histolojik tipine göre p53 genotipinin dağılımı | 53 |
| Tablo 9: Tümör dokusunda lokalizasyona göre HPV pozitifliğinin dağılımı ... | 56 |
| Tablo 10: Hasta grubunda tümör dokusunda HPV(+) ve (-) örneklerde, bireyin p53 genotipinin dağılımı | 57 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | Sayfa No |
|---|-----------------|
| Şekil 1: HPV-16'nın genom haritası. | 19 |
| Şekil 2: HPV-16 ve HPV-18 tarafından malign transformasyon modeli | 24 |
| Şekil 3: Allel spesifik PCR ile p53 kodon 72 polimorfizminin belirlenmesi | 41 |
| Şekil 4: Beta-globin spesifik PCR'a yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. | 46 |
| Şekil 5: p53 kodon 72 polimorfizmine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü..... | 47 |
| Şekil 6: GP5/GP6 spesifik PCR'a yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü | 54 |
| Şekil 7: HPV-16 için spesifik PCR'a yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü..... | 55 |
| Şekil 8: HPV-18 için spesifik PCR'a yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü..... | 55 |
| Şekil 9: HPV-33 için spesifik PCR'a yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü | 56 |

1. ÖZET

Bazı p53 polimorfizmleri artmış kanser geliştirme riskiyle ilişkilidir. p53'ün yaygın bir polimorfizmi, kodon 72'de gerçekleşmektedir. Bu polimorfizm ya bir prolin (CCC) ya da bir arginin residüsü (CGC) içeren varyant bir proteinle sonuçlanmaktadır. p53 TS geninin kodon 72 polimorfizminin ayrıca HPV-ilişkili kanserlerin gelişiminde bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmektedir.

Bu çalışmada gastrointestinal sistem kanserlerinde HPV'nin farklı tipleri ile p53 kodon 72 polimorfizmi arasındaki ilişki araştırıldı. Genomik DNA hasta grubunda parafine gömülü doku kesitlerinden ve kontrol grubunda periferik kandan izole edildi. Çalışmaya 106 gastrointestinal sistem kanser hastası ve 107 sağlıklı birey dahil edildi.

p53 kodon 72 polimorfizmi genotip frekansları, hasta grubunda %88.7 (94/106) Arg/Pro, %11.3 (12/106) Arg/Arg, kontrol grubunda ise %46.7 (50/107) Arg/Pro, %45.8 (49/107) Arg/Arg ve %7.5 (8/107) Pro/Pro'dir. Hasta ve kontrol grubu arasında kodon 72 genotipi açısından istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edildi ($p < 0.01$). Tümör dokusu örneklerinde 41 HPV (+) örneğin 36'sında Arg/Pro ve 5'inde Arg/Arg tespit edildi. Ancak Arg/Pro ve Arg/Arg genotiplerinin HPV (+) ve (-) örneklerdeki dağılımında önemli bir fark saptanmadı ($p > 0.05$).

Bu çalışmanın sonuçlarına göre p53 kodon 72 polimorfizminin gastrointestinal sistem kanserlerine yatkınlık oluşturabileceğini, ayrıca HPV'nin gastrointestinal sistem kanser patogeneğinde bir rol oynayabileceğini fakat p53 polimorfizminin herhangi bir HPV tipi ile ilişkisi olmadığını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Kanser, p53 kodon 72, HPV

2. ABSTRACT

Some of p53 polymorphisms have been associated with increased risk of cancer development. A common polymorphism of p53 at codon 72 results in either a variant protein with a proline (Pro) residue (CCC) or an arginine (Arg) (CGC) residue. Furthermore, recent reports suggest that polymorphism at codon 72 of the p53 tumor suppressor gene might be a risk factor in the development of HPV associated cancers.

In this study we investigated the relationship between different type HPV and p53 codon 72 polymorphism in gastrointestinal system cancers. Genomic DNA was isolated parafin embedded tissues in patient group and peripheral whole blood in control group. The study composed of 106 gastrointestinal system cancer patients and 107 healthy control individual.

In patient group, p53 codon 72 genotype frequency, 88.7% (94/106) Arg/Pro, 11.3% (12/106) Arg/Arg, in control group 46.7% (50/107) Arg/Pro, 45.8% (49/107) Arg/Arg and 7.5% (8/107) Pro/Pro. There was statistically significant differences between patient and control groups with regard to codon 72 genotypes ($p < 0.01$). It was detected 36 Arg/Pro and 5 Arg/Arg of 41 HPV (+) samples in tumor tissue samples. However, there was no significant differences the distribution of Arg/Pro and Arg/Arg genotypes in HPV (+) and HPV (-) samples ($p > 0.05$).

Based on the results of this study, we suggest that p53 codon 72 polymorphism may constitute susceptibility to gastrointestinal system cancers, and also HPV may have a role on gastrointestinal system cancer patogenesis, but p53 polymorphism has no relationship with any type of HPV.

Key Words: Cancer, p53 codon 72, HPV

3. GİRİŞ

3.1. Kanserin Genetik Temeli

Kanser, hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalık grubudur. Mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi tüm kanserlerin ortak özelliği olarak kabul edilmektedir. Kanser çeşitlerinin çoğunda mutasyonlar somatik hücrelerde meydana gelir ve bu mutasyonlar üreme hücreleriyle gelecek nesillere aktarılmaz. Ancak kanser vakalarının %1'inde eşey kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılır ve bu değişim yeni neslin kansere yatkınlığını oluşturur (37). Kanser genetiğinin amacı normal bir somatik hücrenin proliferatif bir popülasyona ve invaziv kanser hücrelerine dönüşmesine yol açan seçici ve çok basamaklı mutasyon yolağının anlaşılmasını sağlamaktır (68).

Kanserler, kaynaklandığı dokuya göre 3 ana grupta sınıflandırılırlar: **Sarkoma** kemik, kas gibi mezenkimal dokulardan, **karsinoma** barsak mukozası, meme duktusu gibi epitelyal dokulardan, **lenfoma** ise kemik iliği ve lenfatik sistemden kaynaklanır (68).

Bir kitle ya da tümör oluşumuna yol açtığı bilinen hücre çoğalmasına neoplazi denir. Neoplazinin kanser olabilmesi için malign özellik göstermesi, yani kontrolsüz büyümesi, komşu dokulara veya yakın-uzak mesafelere yayılabilmesi (metastaz) özelliklerine sahip olması gerekir. Tümörler metastaz yapmıyorlarsa kanseröz değildir, benign tümör olarak adlandırılırlar (68).

Hücre bölünmesi ve hücre ölümünü kontrol eden çok çeşitli genler bulunmaktadır. Araştırmalar sonucunda bu genlerin mutasyonlarının kanserden

sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bir çok kanserde mutasyon tek bir somatik hücrede olur, daha sonra bölünerek kanser gelişimine yol açar. Herediter kanserlerde ise kanserin başlamasına neden olan mutasyonlar germ hücresine aktarılmakta ve böylece vücudun tüm hücrelerinde yer almaktadır (68).

Normal bir hücreden malign bir kanser hücresine geçişte anahtar faktörler 6 spesifik özellik kazanmaktadır. Hücreler;

- dış büyüme sinyallerinden bağımsız olma,
- dış anti-büyüme sinyallerine duyarsız olma,
- apoptozisten kaçabilme yeteneğinde olma,
- sınırsız sayıda replikasyon geçirebilme,
- güçlü bir anjiogenez yeteneğine sahip olma ve
- doku invazyonu ve metastaz yapabilme yeteneklerine sahip olmalıdırlar (68).

İyonize radyasyon, kimyasallar ve virüsler gibi çevresel karsinojenler genelde etkilerini mutasyona neden olarak gösterirler. Oluşan bu mutasyonlar kanserde merkezi rol oynamaktadır (37). Hayvan virüs ailelerinde yer alan ve tümör virüsü olarak adlandırılan bir çok virüs deney hayvanlarında veya insanlarda doğrudan tümör oluşturabilir. Papillomavirüsler insanda ve birçok değişik canlı türünde benign ve malign tümörler oluşturan küçük DNA virüsleridir (18).

3.1.1. Kanserde Rol Oynayan Genler

Kanser oluşumunda rol oynayan genler; onkogenler ve tümör süpressör genler olarak iki temel alt gruba ayrılırlar:

3.1.1.1 Onkogenler

Bu genlerin normal fonksiyonları hücre proliferasyonunu teşvik etmektedir. Tümör hücrelerinde fonksiyon kazandıran mutasyonlar sonucunda hatalı veya aşırı aktivasyon kazanan formları oluşur. Tek bir mutant allel hücrenin fenotipini etkileyebilir. Bu genlerin mutasyona uğramamış tipi “protoonkogen” olarak adlandırılmaktadır. Onkogenler ilk olarak, bazı kanserlere virüslerin yol açtığı anlaşıldıktan sonra keşfedilmiştir. Bu virüslerin bazıları nispeten komplike DNA genomuna sahipken (SV40 virüs, papillomavirüsler), diğerleri akut transforme edici retrovirüslerdir ve oldukça basit RNA genomuna sahiptirler (68).

Hücrel onkogenler (proto-onkogenler) 5 ana sınıfta toplanmıştır:

- Sekrete edilen büyüme faktörleri
- Hücre yüzey reseptörleri
- DNA bağlayıcı nükleer proteinler (transkripsiyon faktörleri dahil)
- Hücre içi sinyal iletim sistemlerinin komponentleri
- Hücre siklusunda görevli siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve kinaz inhibitörleri (68).

Proto-onkogenlerin aktivasyonu 4 mekanizmayla gerçekleşmektedir:

1. Amplifikasyon ile aktivasyon
2. Nokta mutasyonu ile aktivasyon
3. Yeni bir kimerik gen oluşturan translokasyonla aktivasyon
4. Bir proto-onkogenin, transkripsiyonel olarak aktif olan bir kromatin bölgesine translokasyonu sonucu aktivasyonu (68).

3.1.1.2. Tümör süpressör (TS) genler

Tümörigeneziste önemli rol oynayan ikinci gen grubu TS genlerdir. Bu genler, anormal hücre proliferasyonunun kontrolünde rol oynayan genler olarak tanımlanırlar. Kayıpları ya da inaktivasyonları malignansinin gelişimiyle ilişkilidir. Tümör gelişiminden önce genin her iki kopyası da mutasyona uğramış olmalıdır (47).

Genel olarak mitoz iki yolla düzenlenmektedir: 1. Hücre bölünmesini baskılayan genlerin normal işleviyle, 2. hücre bölünmesini yürüten genlerin normal işleviyle. Birinci sınıfı oluşturan genler TS genlerdir. Bu genler hücre siklusu bölümlerinin birbirine geçişini baskılar ya da inaktive eder ve hücre bölünmesini durdurur. Bu genler kalıcı olarak inaktive olursa ya da mutasyonlarla ortadan kaldırılırsa, hücre bölünmesinin kontrolü kaybolur ve hücre kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlar (37).

TS genler, delesyon ya da nokta mutasyonları sonucu sessizleşebilir fakat en sık görülen üçüncü mekanizma promotorun metilasyonudur. Tümör hücre DNA'sı normal hücre DNA'sına göre hipometiledir ancak genlerin

promotorlarındaki spesifik CpG dinükleotidlerinin metilasyonu gerçekte hemen her tip insan neoplazmasında bulunmaktadır ve genin uygun olmayan transkripsiyonal sessizleşmesi ile ilişkilidir. Bazı TS genler için metilasyon, nokta mutasyonuna bir alternatif olarak oluşurken diğerlerinde tümör-spesifik fonksiyon kaybında bilinen tek mekanizmadır (68).

En önemli tümör supressör genlerden bir p53 genidir. p53 normalde TS bir gen olarak hücre siklusunun G1'den S fazına geçişini kontrol eder. p53 mutasyonları meme, akciğer, mesane ve kolon kanserini içeren pek çok kanser tipinde bulunmuştur. Tüm kanser vakalarının %50'sinin p53 genindeki mutasyonlarla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (37).

3.1.2. Hücre Siklusunun Kontrolü

Herhangi bir zamanda herhangi bir hücre farklı davranış seçeneklerine sahiptir: ya sabit kalırlar, ya bölünürler veya ölürler (apoptozis) ya da bazıları farklılaşırlar. Hücreler iç ve dış sinyallere cevap olarak bu yollardan birini seçerler. Onkogenler ve TS genler bu sinyalleri oluşturmada ve yorumlamada anahtar rol oynarlar. Bölünmeyi seçen hücrelerde siklus boyunca birkaç önemli kontrol noktası vardır. Bunlar:

- 1. G1-S kontrol noktası:** Tamir edilmeyen DNA hasarı olduğunda DNA replikasyonu durdurulur ve apoptozis gerçekleşir.
- 2. G2-M kontrol noktası:** Bu kontrol noktasında DNA replikasyonu ve herhangi bir hasarın tamiri tam olarak tamamlanmadan hücrelerin mitoz girme engellenmektedir.

3. Spindle (iğ ipliği) kontrol noktası: Mitoz esnasında tüm kromozomlar iğ ipliklerine doğru olarak tutunmadıkça kromozom segregasyonu bu kontrol noktasında engellenmektedir (68).

3.2. Genetik Varyasyon ve Polimorfizm

Polimorfizm, bir toplumda sadece tekrarlayan mutasyonlarla sürdürülemeyecek oranlarda var olan, nadir sıklıktaki, devamlılık göstermeyen iki veya daha fazla genetik özelliğin bir arada olması olarak tanımlanabilmektedir (2). DNA dizisinde doğal olarak meydana gelen varyasyonlar birkaç şekilde oluşabilir; tek nükleotid substitüsyonu, tek ya da birkaç nükleotidin insersiyonu veya delesyonu, tekrarlayan dizi sayısındaki değişimler ve kromozom yapısındaki büyük değişimler. Bunlar sıklıklarına ve hastalık yapma yeteneklerine bağlı olarak polimorfizm ya da mutasyon olarak adlandırılmaktadırlar (6). Normal populasyonda %1'den daha fazla sıklıkta olan değişimler polimorfizm olarak kabul edilmektedir (6, 13). %1'den daha az sıklıkta olanlar ise genellikle hastalıklarla sonuçlanmaktadır. Sadece hastalıklarla sonuçlanan mutasyonlar değil aynı zamanda bazı polimorfizmler de fonksiyonel olarak önemli olup hastalık patogenezinde rol oynamaktadır. Tek nükleotidi içeren değişimler tek nükleotid polimorfizmi (SNP, single nucleotide polymorphism) olarak adlandırılır. Bir polimorfizmde yaygın olan dizi wild-tip allel, nadir olan ise varyant alleldir (6).

SNP'ler genetik polimorfizmlerin en yaygın formudur. Pozisyonlarına göre ve genetik kodu değiştirme yollarına göre farklı alt tiplere sınıflandırılmaktadır. Bir genin 5' UTR veya 3' UTR gibi promotorda lokalize

SNP'ler üretilen protein miktarını çeşitli yollarla etkileyebilirler. Nükleotid değişiklikleri spesifik transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını değiştirebilir, böylece transkripsiyon oranını etkileyebilir. Ya da mRNA stabilitesini etkileyebilir ve üretilen protein seviyesini değiştirebilir. Kodlayıcı bölgedeki SNP'ler klinik olarak oldukça önemli potansiyele sahiptirler. Yapısal/fonksiyonel olarak farklı bir aminoasit değişimi sadece proteinin yapısı ve/veya stabilitesini etkilemez aynı zamanda protein-protein etkileşim yollarını da bozabilir. Bu tip fonksiyonel etkilere ilave olarak daha kompleks seviyelerde gerçekleşen polimorfizmler de vardır. Özellikle intron-ekzon sınırlarında olmak üzere ekzon veya intronlardaki varyasyonlar alternatif splicingi etkileyebilir ve böylece farklı protein formlarının üretilmesine yol açabilir. Lokus kontrol bölgelerindeki polimorfizmler ise potansiyel olarak gen ekspresyonunu etkileyebilir ve hastalıklarla sonuçlanabilir. Böylece SNP'ler çok farklı etkilere sahip olabilirler (6).

3.3. p53 Geni

Genomik instabiliteye yol açan en önemli sebep, p53 transkripsiyon faktörünü kodlayan gen olan p53'ün delesyon veya mutasyonudur. Bu kayıp muhtemelen kanserde görülen en sık genetik değişikliktir. Bu durum p53'ün merkezi önemini ortaya koymakta ve bu yüzden "**genomun muhafızı**" olarak adlandırılmaktadır. DNA'da hasar meydana geldiğinde bu tamir edilemezse apoptozis tetiklenir. p53 bu işlemlerde önemli bir role sahiptir. p53 proteini çabuk yıkıldığından normal olarak bir hücredeki seviyesi düşüktür. Hücresel stres

sonucu meydana gelen sinyaller p53'ün fosforilasyonuna ve stabilizasyonuna neden olur. Bu da p21^{WAF/CIP1} gibi genlerin p53-bağımlı transkripsiyonlarının artmasına yol açar. Bunlar hücre siklusunu inhibe ederek apoptozisi kontrol ederler. p53'ü olmayan tümör hücreleri hatalı DNA'nın replikasyonuna devam eder ve apoptozise uğramazlar. Bununla birlikte p53 kaybı kanser gelişiminde nispeten geç bir olaydır ve tümör gelişiminin erken evreleri p53 tarafından engellenemez (68).

p53 geni 17. kromozomun kısa kolunda lokalize olup DNA transkripsiyonu, hücre siklusunun düzenlenmesi ve tümör baskılanmasında kritik rol oynayan bir protein kodlamaktadır (61, 64). Genomun muhafızı olan bu gen DNA hasarına cevap esnasında hücre siklusunun durmasını sağlayarak replikatif DNA sentezi ve/veya mitoz yeniden başlamadan önce hatalı DNA'nın tamirini sağlamaktadır. Normal p53 fonksiyonu kaybedildiğinde hücreler ya ölmektedir ya da çoğalmaya devam etmektedir (64).

p53 geni 20 kb boyutunda olup 11 ekzon içermektedir (8). p53, 5 yüksek korunmuş bölge ve 4 fonksiyonel domain içeren 393 aminoasitlik ve 53 kDa'luk bir fosfoprotein kodlamaktadır (57). p53 geninin protein ürünü yaklaşık 20 dakikalık kısa yarı ömre sahip olduğundan normal hücrelerde tespit edilemez. Primer olarak nükleusta lokalizedir ancak hücre bölünmesinin G1 aşamasında ve onu takip eden DNA sentezi esnasında sitoplazmada da tespit edilebilir. p53 proteini farklı fonksiyonlara sahip üç spesifik bölge içermektedir:

- Amino ucu bir çok asidik aminoasit ve çok sayıda prolin içermektedir. Bu bölge p53'ün transaktivasyonel özelliklerinden sorumludur.

- Karboksil ucu hidrofilitir. Bu bölge üç nükleer lokalizasyon sinyali içerir ve bu bölgedeki mutasyonlar, primer olarak sitoplazmada bulunan bir proteinle sonuçlanır. Bu bölge ayrıca p53 proteininin oligomer oluşturma yeteneğinden de sorumludur.
- p53 proteininin merkezi bölgesi ise oldukça hidrofobiktir. Türler arasında yüksek korunmuşluğa sahiptir. Bu bölge DNA bağlanma aktivitesine sahiptir ve transkripsiyonel aktivasyona uğrayacak genlerdeki hedef diziler ile etkileşir. İnsan tümörlerindeki mutasyonların çoğu bu bölgededir (47).

p53, insan tümörlerinin %50'sinden fazlasında anormaldir. p53 proteininin primer fonksiyonu bir tümör supressör olmasıdır. p53 geninde 15 600'ün üzerinde mutasyon kaydedilmiştir. Bu mutasyonların %74'ü missense mutasyonlardır. Mutasyonların %95'i proteinin merkezi bölgesinde görülmektedir (47). p53 genindeki mutasyonlar fonksiyon kaybı yanında fonksiyon kazancını da içeren farklı etkilere sahip olabilir. p53'ün fonksiyon kaybı, hücre siklusunun durdurulması ya da apoptozisin başlatılmasında yetersizliğe sebep olarak genomik instabiliteyle sonuçlanmaktadır. Fonksiyon kazancına sebep olan p53 mutasyonları, wild-tip p53 ile herhangi bir kompleks oluşumundan bağımsızdırlar ve seçici proliferatif avantajla ilişkilidirler. Bu durum p53 genindeki farklı mutasyonların tümörün tedaviye duyarlılığında farklı etkilere sahip olmasına iyi bir delildir (49).

3.3.1. p53 Genindeki Polimorfizmler

İnsan p53 geninde en az 10 farklı polimorfizm belirlenmiştir. Bu polimorfizmlerin fonksiyonel önemi henüz çok iyi bilinmemektedir (79). Bu polimorfizmlerin en sık olanı SNP'ler olup bunların çoğu genin kodlayıcı olmayan bölgelerinde (intron) yer almaktadır. p53'ün kodlayıcı bölgelerinde (ekzon) bulunan polimorfizmler arasında sadece 2 tanesi aminoasit dizisini değiştirmektedir. Bunlar 47. residüde prolinin serine ve 72. residüde arjininin proline dönüşümüdür (57). Bu polimorfizmlerin biyolojik fonksiyonlarına dair ipuçları sadece Arg72Pro varyantı için rapor edilmiştir (21).

3.3.1.1. p53'ün kodlayıcı-olmayan bölgelerindeki polimorfizmler

p53'ün kodlayıcı-olmayan bölgesinde 15 yaygın polimorfizm tanımlanmıştır. Bu doğal varyasyonlardan bazıları kanser geliştirme riskiyle ilişkili olarak bulunmuştur. Kodlayıcı-olmayan polimorfizmlerden 2 tanesi;

- **İntron 3 polimorfizmi (+16 baz çifti):** Bu polimorfizm kodon 72 polimorfizmiyle birlikte en çok çalışılmıştır. Nükleotid 11 951'de lokalize intron 3'de 16 baz çiftlik bir duplikasyon söz konusudur. Sadece bir çalışmada bu doğal varyantın değişmiş bir aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (57).
- **İntron 6 polimorfizmi (G→C):** Bu polimorfizmde nükleotid 13 964'de intron 6'da bir G'nin bir C'e transversiyonu gerçekleşmektedir. Bu durumun, değişmiş p53 fonksiyonuyla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. İntron 6 lokusunun mutasyonlar için sıcak nokta

olabileceği düşünülmektedir. İntron 6 polimorfizmleri ile çeşitli kanser geliştirme riskleri arasındaki ilişki epidemiyolojik çalışmalarla desteklenmelidir (57).

3.3.1.2. p53 proteininin kodlayıcı dizisini değiştiren polimorfizmler

- **Serin 47 polimorfizmi:** SNP P47S'de p53'ün evrimsel olarak korunmuş prolin residüsü serinle değişmektedir. Bu polimorfik varyant oldukça nadirdir. p53'ün S47 formu, wild tip p53 (P47 ya da wt) ile karşılaştırıldığında proteinin proliferasyonu baskılama yeteneğini etkilemediği gösterilmiştir. Ancak daha sonra apoptozisi indükleme yeteneği araştırıldığında S47 varyantının apoptozisi indüklemeye wt tip p53'e oranla azalmış bir yeteneğe sahip olduğu gösterilmiştir. Günümüzde S47 polimorfizminin kanser riski ve terapisindeki etkisi bilinmemektedir (57).
- **Kodon 72 polimorfizmi:** Bu yaygın SNP, 72. aminoasit pozisyonunda bir arjininin (R72) bir proline (P72) değişimiyle sonuçlanmaktadır. Bu polimorfizm, p53 proteininin çoğalmayı baskılama ve apoptotik fonksiyon için önemli olduğu bilinen prolin-zengin bir bölgede gerçekleşmektedir. R72 ve P72 varyantlarının allelik dağılımında önemli bir fark olduğu ilk kez Beckman ve ark. tarafından gösterilmiştir. Bu araştırmacılar bir Nijer popülasyonunda %17 ve bir İsveç popülasyonunda %63 olmak üzere P72 allel frekansında önemli bir farklılık tespit etmişlerdir. Aynı coğrafik enlemde yaşayan popülasyonlar arasında herhangi bir farklılık

bulmamışlardır. Araştırmacılar P72 allel sıklığının enlemle farklılık göstererek ekvatora yakın populasyonlarda arttığını ortaya koymuşlardır. Bu gözlemlere göre kodon 72 varyantının aktivitesinin farklı olduğunu ve aktivitedeki bu farklılığın yüksek ultraviyole ışık alan bölgelerde seleksiyona maruz kalacağını ileri sürmüşlerdir (57).

3.4. p53 Kodon 72 Polimorfizmi ve Kanser Yatkınlığı Arasındaki İlişki

İnsan populasyonları arasında wild-tip p53 proteininin en az iki formu bulunmaktadır. Bunlar; p53'ün transaktivasyon domaininde kodon 72'de Arg'nin (CGC) bir Pro (CCC) ile değişimidir (79). Bu değişim farklı elektroforetik mobiliteye sahip yapısal olarak değişmiş bir proteinle sonuçlanmaktadır (57). Buna göre 3 farklı genotip ortaya çıkmaktadır. Bunlar homozigot arjinin (Arg/Arg), homozigot prolin (Pro/Pro) ve heterozigot (Arg/Pro) şeklindedir (70). Bu iki allelin fonksiyonel farklılıkları henüz iyi bilinmemektedir (79). p53 TS genindeki bu yaygın polimorfizm insan kanser yatkınlığıyla ilişkili olarak bulunmuştur (11, 20, 50, 65, 75). p53 polimorfizminin Pro varyantı özellikle akciğer, meme ve kalın bağırsak kanserleri için potansiyel bir risk faktörü olarak rapor edilmiştir (79).

Farklı kodon 72 genotipleri mide karsinojenlerine değişik cevaplar verebilir. Böylece bir genotip diğerleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek kanser geliştirme riski taşıyabilir (82). Kodon 72 varyantlarının tümör yatkınlığıyla ilişkili olduğu bir çok çalışmada rapor edilmiştir. Pro/Pro genotipli hastalar diğer genotiplere kıyasla özellikle sigara içen hastalarda akciğer kanseri geliştirmeye daha

yatkındırlar. Tersine sigara içmeyen akciğer kanserli hastalarda homozigot arjinin genotipinin sıklıkla artması söz konusudur. Pro allelinin (Pro/Pro veya Arg/Pro) artmış sıklığı ayrıca meme kanserli hastalarda da tespit edilmiştir (64). Wang ve ark. (75) ile Jin ve ark. (32) prolin homozigot bireylerin akciğer kanseri geliştirmede yüksek bir riske sahip olduğunu göstermişlerdir.

p53 varyantları major insan neoplazmları için risk faktörü olarak etki edebilir ve çevresel risk faktörlerinin modülasyonunda önemli bir rol oynayabilirler (64). Kodon 72 polimorfizmi ve kanser riski arasındaki güçlü ilişki çeşitli kanserlerde rapor edilmesine rağmen meme ve kolorektal karsinom için yetersiz kalmıştır (40). Son zamanlardaki çalışmalar sonucunda p53 proteininin 72. pozisyonundaki bir prolin residüsünün bir arjinin residüsü ile substitüsyonu ile sonuçlanan p53 gen polimorfizminin, kolorektal adenomun malign transformasyonunda bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmektedir (46).

Çeşitli çalışmalarda homozigot Arg alleleline sahip mide kanserli hastalar Pro alleleline sahip olanlarla (Pro homozigot ya da Arg/Pro heterozigot) karşılaştırıldıklarında hastalığa daha genç başlangıç yaşına sahip oldukları gözlenmiştir. p53 Arg/Arg varyantı hızlı kinetikle apoptozisi indüklemekte ve Pro/Pro varyantından daha etkili bir şekilde transformasyonu baskılamaktadır. Pro alleli varlığının terapötik dirençle ve kötü prognozla ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (82).

Servikal kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada kodon 72 Arg homozigotluğunun invaziv servikal karsinom gelişimi için bir risk faktörü olabileceği tespit edilmiştir (80).

Toda ve ark. resesif p53 mutantlı kanserlerde Arg 72 allelinin tercihi bir seçiciliği olduğunu bulmuşlardır (72). Buna göre resesif p53 mutantlarının, p53'ün Arg 72-bağımlı inaktivasyonu ile seçici bir büyüme avantajı kazandığını ileri sürmektedirler.

Kazak populasyonunda yapılan bir çalışmada HPV-ilişkili özofageal squamus hücre karsinomlarında p53 kodon 72 polimorfizminin potansiyel bir rolü olabileceği ve Pro allelleriyle karşılaştırıldığında Arg alleli taşıyan bireylerin artmış bir özofageal kanser riskine sahip oldukları öne sürülmektedir (45).

Kodon 72 polimorfizminin mesane karsinogenezinde de rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. Son zamanlarda mesane kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada Arg/Arg genotipi taşıyan bireylerin mesane kanseri gelişimi için artmış bir riske sahip olduğu gözlenmiştir (66).

p53 kodon 72 polimorfizminin etnik gruplar arasında da önemli bir farklılık göstermektedir (30, 43). Pro/Pro genotipi siyah ırkta %37, Asyalılarda %22 ve beyaz ırkta %7 frekansta tespit edilmiştir. Bu yüzden çeşitli çalışmalardaki allel frekanslarının farklılığı hasta populasyonunun hem coğrafik hem etnik farklılıklarını yansıtabilir (27, 64).

Kanser gelişimi için potansiyel bir risk faktörü olarak 2 allelin dağılımındaki farklılığın gösterilmesine ilave olarak, farklı kodon 72 genotiplerinin hastalığın prognozunu da etkileyebildiği ortaya konmuştur. Wang ve ark. Pro/Pro genotipli akciğer kanserli hastaların Arg/Pro genotipli hastalardan daha kötü prognoza sahip olduklarını istatistiksel olarak bulmuşlardır (75).

Tüm bu çalışmalara göre, p53 varyantları major insan neoplazmları için risk faktörleri olabilirler ve kanser için çevresel risk faktörlerinin modülasyonunda önemli bir rol oynayabilirler (64).

3.5. İnsan Papillomavirüsü

İnsan (human) papilloma virüsleri (HPV) uzun süre siğil virüsleri olarak bilinmişlerdir (31) ancak 1949 yılında viral partiküller olarak belirlenmişlerdir (26). Papillomavirüs grubuna ilgiyi arttıran en önemli sebep, insan kanserlerinin yaygın bir formu olan serviks kanserleriyle olan ilişkisinden kaynaklanmaktadır. Bu ilişki 1974'den öncesine kadar düşünülmemiştir. Ayrıca nadir bir insan deri hastalığı olan epidermodisplazi verrusiformiste de önemli bir rol oynadığından şüphelenilmiştir. Yaklaşık olarak 10 yıldan daha az bir süre sonra serviks kanser biyopsilerinden direkt olarak spesifik HPV tiplerinin izolasyonu ile genital kanserlerdeki rolleri üzerinde detaylı çalışmalar da başlamıştır (26). Yaklaşık olarak 100'den fazla farklı HPV karakterize edilmiş olup yeni tipler bu listeye eklenmeye devam etmektedir (16).

HPV izolatları kutanöz ve mukozal olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Her bir grupta bazı karsinojenik tipler bilinmektedir (31). Mukoza-ilişkili HPV'ler, tümör indüklemeye yeteneklerine bağlı olarak 2 alt tipe ayrılabilir:

1. Düşük riskli HPV'ler. Örnek olarak HPV-6 ve HPV-11
2. Yüksek riskli HPV'ler. Örnek olarak HPV-16 ve HPV-18 (3).

HPV-6 ve HPV-11 gibi bazı HPV tipleri benign proliferatif lezyonlarla ilişkili olduğundan bunlar "düşük riskli", HPV-16, HPV-18 ve HPV-33'ü içeren

diğer bazıları ise çeşitli karsinomlarla ilişkili olduklarından “yüksek riskli” olarak düşünölmektedir (62).

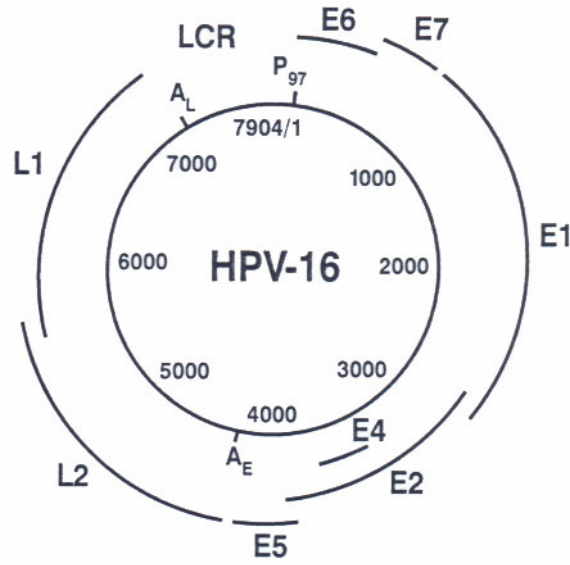
Bir HPV tipi diğer tipler ile nükleotid düzeyinde %90’dan daha az benzerliğe sahiptir. %98’den fazla benzerliğe sahip HPV’ler, tip varyantları olarak düşünölmektedir (71).

3.5.1. HPV Yapısı ve Genomu

Papillomavirüsler ikosahedral simettrili ve genomu çevreleyen 72 kapsomerli zarsız DNA virüsleridir. Virüsün dış protein kılıfı, bir major ve bir minör olmak üzere 2 protein içermektedir. HPV’nin genetik bilgisi yaklaşık 8.000 baz çifti içeren halkasal, çift zincirli bir DNA molekülünde kodlanmaktadır (10). Papillomavirüsler küçük boyutlarına rağmen moleküler biyolojileri oldukça komplekstir. Özetle;

- Transformasyonda görevli 3 onkogen olan E5 (E, early), E6 ve E7
- Transkripsiyon ve replikasyonda görevli 2 regölatör protein olan E1 ve E2
- Viral kapsidi oluşturan 2 yapısal protein olan L1 (L, late) ve L2’yi içermektedirler (74).

Tipik bir HPV virüsünün genom yapısı şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1: HPV-16'nın genom haritası. E1-E6 erken gen bölgeleri, L1 ve L2 geç gen bölgeleri. Viral uzun kontrol bölgesi (LCR) replikasyon ve transkripsiyon bölgelerini içerir (10).

Tüm viral alt tipler replikasyonda görev yapan erken genler ve viral kapsid proteinlerini kodlayan geç genleri içermektedirler (3). Yaklaşık 4.500 baz çifti içeren erken bölge, plazmid replikasyonu, transkripsiyonun regülasyonu ve transformasyon aktivitesinden sorumlu genleri içermektedir (10). Viral entegrasyon tipik olarak viral E1 ve E2 bölgelerinde meydana gelmektedir. Bu genler viral gen ekspresyonu ve replikasyonunu düzenleyen proteinleri kodlamaktadır. E1 proteini viral DNA replikasyonu için önemli olan helikaz aktivitesine sahiptir. E2 ise viral transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir DNA-bağlayıcı protein kodlamaktadır (3, 51). E1 proteini, viral replikasyonun başlamasında anahtar rol oynamaktadır ve potansiyel bir terapötik adaydır (10). Entegrasyon esnasında E1 ya da E2 genlerinin bozulması, E6 ve E7 viral proteinlerinin kontrolsüz ekspresyonuna yol açar (3). Buna bağlı olarak E6 ve E7

onkoproteinleri karsinogenezde muhtemelen önemli roller oynamaktadırlar (7, 31). Genetik çalışmalar sonucunda virüsün transformasyon aktivitesi E6 ve E7 genleri olarak haritalanmıştır. Bu genler hücreleri transforme edebilme yeteneğine sahiptirler. HPV genomunun geç bölgesi ise yaklaşık 2.500 baz çifti içermekte olup viral kapsid proteinlerini kodlamaktadır. Kalan 1000 baz çifti erken ve geç genler arasında lokalize olan bir regülatör bölgeyi kapsamaktadır. E6 ve E7 genlerinin transformasyon aktivitesi onların hücre siklusunda görevli hücre proteinleri ile olan interaksiyonlarından kaynaklanmaktadır. Özellikle E6 proteininin hücresel p53 proteinine bağlandığı ve E7 proteininin ise retinoblastoma (Rb) gen ürününe bağlandığı tespit edilmiştir. E6'nın p53'e bağlanması bu hücresel proteininin degradasyonuna yol açarak p53'ün hücre siklusunu düzenleme yeteneğinde etkili bir azalmaya sebep olmaktadır (10).

HPV'nin kodlayıcı bilgisinin tümü tek bir zincirde lokalizedir. Transkripsiyon muhtemelen tek bir promotordan (P97) tek bir yönde meydana gelmektedir (10). HPV'ler litik olmayan virüslerdir. Kendileri için gerekli olan tüm enzimleri kodlamadıkları için DNA replikasyonları sınırlıdır ve konakçı hücre DNA sentez sistemine bağımlıdır (14, 51).

Yüksek riskli virüslerin E6 ve E7 genleri, en iyi HPV-16 ve HPV-18'de çalışılmış ve hem E6'nın hem E7'nin transforme edici özelliklere sahip oldukları gösterilmiştir. HPV-16 ve HPV-18 tarafından kodlanan E6 proteinlerinin hücresel p53 ile spesifik ilişkisi in vitro olarak gösterilmiştir. Scheffener ve ark. çeşitli HPV tiplerinin E6 proteinlerinin p53 degradasyonunu stimüle etme yeteneklerini araştırdıkları in vitro çalışmada, önceki çalışmalarla uyumlu olarak HPV-16

E6'nın HPV-18 E6'dan 3 kat daha etkili olarak p53 degradasyonunu aktive ettiğini tespit etmişlerdir (62). Bu çalışmada artmış HPV-6 ve HPV-11 E6 proteinlerinin varlığında p53 stabil kalmıştır. p53'ün E6-teşvikli degradasyonu ATP hidrolizine bağımlı olarak gerçekleşmektedir ve p53 degradasyonunda ubiquitin-bağımlı proteaz sistemi rol oynamaktadır.

3.5.2. HPV Onkoproteinleri

Yüksek risk HPV'ler büyüme-stimüle edici ve transforme edici özelliklere sahip en az 3 protein kodlamaktadırlar. Bunlar, E5, E6 ve E7'dir (25, 74).

E5 proteini hidrofilik bir protein olup tercihi olarak golgi aygıtı ve plazma membranında bulunmaktadır. E5 için kodlayıcı açık okuma çerçevesi servikal karsinom hücrelerinde sıklıkla delesyonludur (25). E5, epidermal büyüme faktör reseptörlerini aktive ettiği düşünülen proteinler kodlamaktadır (4).

Viral olarak indüklenmiş tümörlerin büyük bir kısmında E6 ve E7 viral proteinlerinin ekspresyonları seçici olarak korunmakta ve bu durum direkt olarak hücresel transformasyonda rol oynamaktadır (3).

HPV E6 onkoproteini yaklaşık 150 aminoasitlik bir protein kodlamaktadır. Yüksek-riskli E6 proteinlerinin en önemli biyolojik fonksiyonları p53 tümör supressor proteininin inaktivasyonunda rol oynamalarıdır. E6, p53-aracılı yolları iptal ederek hücre proliferasyonunu teşvik etmektedir (3). E6 Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan diğer bir proapoptotik protein Bak'ın degradasyonuna da aracılık ederken, aynı zamanda konakçı hücre telomerazını da aktive etmektedir (25). Ayrıca HPV-16 E6 proteininin p53, p300 ve transkripsiyonel koaktivatör

ADA3'ün transkripsiyonel aktivitesi için önemli olan ilave hücrel faktörler ile de etkileşebildiği rapor edilmiştir (51).

E7 onkoproteini ise amino-terminal domainli 100 aminoasitlik bir proteindir. Yüksek riskli E7 proteinleri, retinoblastom (Rb) tümör süpressör gen ürününü içeren çeşitli konakçı hücrel proteinler ile kompleks oluşturmaktadır. E7 ile olan bu kompleksler Rb ve ilişkili proteinlerin fonksiyonel inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. HPV-16 E7'nin, E2F transkripsiyon faktör komplekslerinin inhibisyonunda görev yapan Rb proteininin fonksiyonunu engellediği gösterilmiştir. Bu durum transkripsiyonel olarak aktif E2F salınmasına yol açarak proliferasyon-ilişkili proteinlerin transkripsiyonu indüklenmiş olur. Çeşitli çalışmalarda ayrıca E7 onkoproteininin p53 fonksiyonunu engelleme yeteneği olduğu da gösterilmiştir (3). E7'nin ayrıca p300, CBP ve pCAF transkripsiyon kofaktörleri ile ilişkisi olduğu rapor edilmiştir (5, 9, 29). E7 ayrıca bazı siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin potent bir inhibitörüdür (25). Son zamanlarda HPV-16 E7'nin, anormal sentrozom duplikasyonunu indüklediği ve bunun da çok kutuplu anormal mitoz ve aneuploidiye yol açtığı gösterilmiştir fakat E7 onkogeni tarafından sentrozom homeostazisini etkileyen mekanizma henüz bilinmemektedir (52).

Düşük risk HPV tipleri E6 proteinleri düşük afiniteyle p53'e bağlanırlar fakat degradasyona yol açmazlar (41). HPV-6 ve HPV-11'in E7 proteinleri, HPV-16 ve HPV-18'in E7 proteinlerinden sırasıyla 5 kat ve 20 kat daha düşük bir afiniteyle Rb proteinine bağlanmaktadır (78).

E6 ve E7 proteinlerinin mitotik siklusta görevli diğer proteinler olan p53 ve Rb proteinlerine bağlanması, sürekli proliferasyonun konakçı hücre proteinleriyle etkileşen viral proteinlerden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. E7'nin diğer mitotik hücresel proteinler olan siklin E, siklin A, siklin D1 ve E2F ile interaksyonu da oldukça önemlidir. Bununla birlikte E7-Rb ve E6-p53 bağlanmaları, hücrenin yazgısında indirekt olarak önemli role sahip olabilir (26).

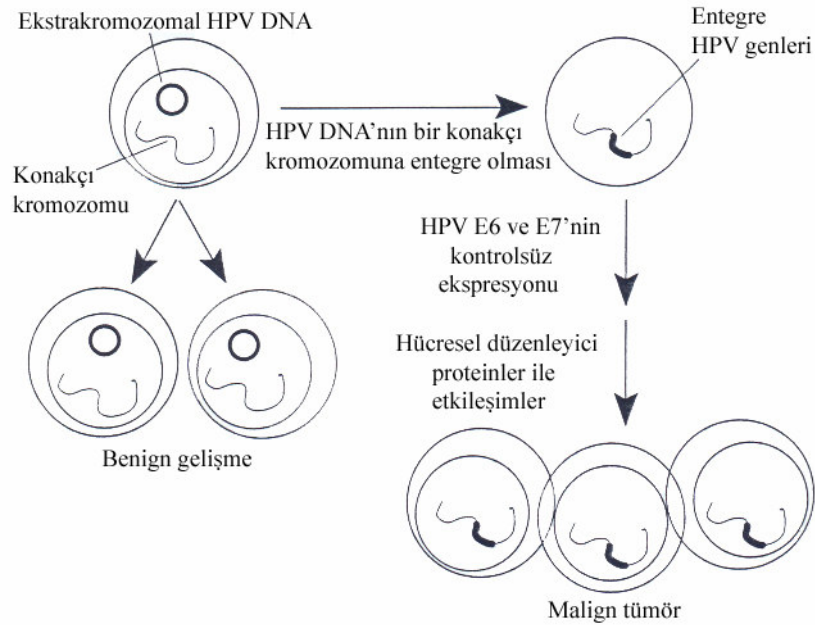
İnsan karsinogenezisi bir genomik instabilite hastalığı olarak karakterize edilmektedir. İnsan solid tümörlerinin büyük çoğunluğu aneuploidi başta olmak üzere çeşitli kromozom anomalileri içermektedir. Genomik instabilite yüksek risk-HPV-ilişkili erken premalign lezyonlarda da rapor edilmiştir. Yüksek risk HPV E6 ve E7 onkoproteinleri birbirlerinden bağımsız olarak normal insan hücrelerinde genomik instabiliteyi teşvik edebilirler ve sentromer anomalilerini indükleyerek mitotik defektler ve aneuploidiye neden olurlar (51).

HPV'ler farklı insan hastalıkları spektrumuyla ilişkilidir. İnsanlarda papillomavirüs infeksiyonlarının çoğu asemptomatik olup klinik olarak malignansilerden ziyade siğillerle sonuçlanan infeksiyonlardır. Bununla birlikte 1980'lerde özellikle servikal kanser ve belirli HPV tipleri arasında güçlü bir ilişkinin gözlenmesiyle, papillomavirüslerin hücrelerin malignant dönüşüme aracılık etme yetenekleri dikkat çekmiştir (10).

3.5.3. HPV'nin Transformasyon Mekanizmaları ve İnsan Kanserlerindeki Rolü

Son zamanlardaki çalışmalar bazı virüs tiplerinin, özellikle HPV'nin, kolorektal kanser patogeneziyle ilişkili olabileceğini desteklemektedir. HPV'nin karsinojenik etkisi konakçı hücre DNA'sına viral entegrasyon ve viral onkoproteinlerin ekspresyonundan kaynaklanmaktadır (19).

HPV tiplerinin hücreleri transforme edebilmesiyle ilgili bilgilerin çoğu genital kanserlerden izole edilen iki virüs olan HPV-16 ve HPV-18 üzerindeki çalışmalardan elde edilmiştir. Ancak tüm HPV tipleri malignansiyi indüklemeye aynı mekanizmaları kullanmazlar. Özellikle HPV-33 farklı bir mekanizmayla hücreleri transforme etmektedir. HPV-16 ve HPV-18 tarafından hücrelerin transformasyonunun ait bir model şekil 2'de gösterilmiştir (10).



Şekil 2: HPV-16 ve HPV-18 tarafından malign transformasyon modeli (10. kaynaktan modifiye edilerek alınmıştır).

Tüm HPV tipleri konakçı hücre nükleusunda replike olmaktadır. Benign HPV-ilişkili deri lezyonlarında HPV genomu tipik olarak konakçı hücrenin DNA'sından ayrı olarak bulunur ve ekstrakromozomal bir epizom ya da plazmid olarak replike olur. HPV-16 ve HPV-18 ile ilişkili malign lezyonlarda ise viral DNA genellikle konakçı kromozomuna entegre olmaktadır. Konakçı hücre DNA'sına entegre olmak için viral genomda bir kırık oluşmalıdır. Bu kırık genomda rastgele bir bölgede meydana gelmez. Kırıkların çoğu virüsün E1/E2 bölgelerinde oluşmaktadır. Bu bozulma, iki genin fonksiyon kaybına, E6 ve E7 genlerinin deregülasyonuna ve bunun neticesinde de hücresel transformasyona yol açmaktadır (10).

HPV genomu konakçı hücrelerin farklı kromozomal bölgelerine entegre olabilmektedir. Bu entegrasyon lokuslarını karakterize etmek için yapılan bir çalışmada 51 farklı entegrasyon lokusu tespit edilmiş olup bunların hemen hemen tüm kromozomlarda yer aldığı görülmüştür. Bu çalışmada HPV dizilerinin kanser ilişkili genler ve frajil bölgelere yakın olarak entegre olduğu bulunsa da tercihi bir bölge ya da entegrasyon motifi tespit edilmemiştir (77). Farklı çalışmalarda primer genital karsinom ya da hücre hatlarında HPV dizisi için entegrasyon bölgeleri 1q21-q23, 3p14, 3p21, 3q26-q29, 8q21-q23, 12q14-q15, 13q21 ve 18q21 kromozomal bant bölgelerine ya da kromozom 1q ve 22q, 3p ve 13q, 3p ve 14'ü içeren translokasyon kırık noktalarına ve ayrıca myc genlerini içeren 8q24 ve 2p24 kromozom bantlarına yakın olarak haritalanmıştır (60). Son zamanlardaki deliller malignansiyle ilişkili HPV entegrasyon bölgelerinin tercihi

lokalizasyondan ziyade insan genomu boyunca geniş bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte HPV DNA entegrasyonunun fragil bölgelerde ya da yakınında, translokasyon kırık noktalarında, onkogenler veya genlerin kodlayıcı bölgelerinde olmaya meyilli olduğu tespit edilmiştir (22).

HPV'nin hücrel proteinler ile etkileşen transforme edici proteinleri hücre proliferasyonunun kontrolünde etkilidir (17). Yüksek riskli HPV'lerin E6 proteini, p53'ün ubiquitin-aracılı proteoliz ile parçalanmasını teşvik etmektedir. Genom stabilitesinin korunmasında önemli rol oynayan p53 proteini normal bir hücrede DNA hasarı gerçekleştiğinde artmaktadır. p21^{WAF/CIP1} gibi hücrel hedef genlerin transkripsiyonel olarak aktivasyonu ile hücre siklusunun G1'de durdurulması teşvik edilmektedir. Böylece DNA hasarının onarılması için gerekli zaman sağlanmaktadır. Alternatif olarak DNA hasarına p53-aracılı cevap apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanabilmektedir (28).

HPV'ler 1995 yılında Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) tarafından resmi olarak, insanlarda karsinojenik bir ajan olarak bildirilmiştir. Bu sonuç, insanlarla yapılan epidemiyolojik çalışmalar, hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar ve deneysel çalışmalar ile elde edilmiştir. Bununla birlikte kanserdeki rolleri kabul edilmesine rağmen papillomavirüsler malign transformasyon için tek başlarına yeterli değildir ve karsinojenik süreç için diğer faktörler de olmalıdır (17).

İnsan kanserlerinde HPV ile ilgili verilere göre HPV DNA tüm kanserlerin yaklaşık %10'unda bulunmaktadır (26). HPV DNA baş ve boyun kanserleri, oral kanser, özofageal kanser, bazı deri kanserleri ve akciğer kanserini içeren tümör dokularında tespit edilmiştir (12). Bilharzial mesane kanserinde de HPV'nin

etiyojik bir rolü olabileceği öne sürölmektedir (36). PCR (polimerase chain reaction) ve *in situ* hibridizasyon teknikleri ile kolorektal kanser dokularında HPV DNA tespiti, HPV enfeksiyonunun kolorektal kanser gelişimiyle de ilişkili olabileceğini desteklemektedir. Bununla birlikte daha eski çalışmalarda HPV DNA tespiti PCR ile yapılmamıştır. HPV antijenine dayalı bu çalışmalarda hatalı sonuçlar elde edilebilmiştir (12).

Kolon ve rektum adenokarsinomu dünyada kanser ölümlerinin üçüncü sebebidir. Her yıl 800 000'den fazla yeni vaka teşhis edilmektedir. Servikal ve anogenital kanserlerde rolü olduğu bilinen HPV'lerin son zamanlarda kolorektal kanserlerle de ilişkisi olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır. HPV DNA ve onun antijenleri çeşitli tekniklerle kolon ve rektumun neoplastik lezyonlarında gösterilmiştir (56).

Farklı çalışmalarda kolorektal kanserlerdeki HPV yüzdesinde farklılıklar söz konusudur. Bir çalışmada *in situ* hibridizasyon tekniğiyle kolorektal adenomların %27'sinde, invaziv kolorektal karsinomların %31'inde ve *in situ* kolorektal karsinomların %69'unda HPV DNA tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada PCR tekniği ile kolorektal karsinomların %53'ünde ve adenomların %29'unda HPV DNA tespit edilmiştir. Bu farklı sonuçlar örnek sayısı, örnek toplama ve metod hassaslığındaki farklılıklardan kaynaklanabilir. Ayrıca coğrafik bölge farklılıkları da sonuçların farklı olmasında etkili olabilir. Örnek olarak Latin Amerika ölkeleri, Avrupa ve Kuzey Amerikaya göre daha yüksek bir HPV enfeksiyon riskine sahiptirler (19).

3.6. İnsan Kanserlerinde HPV ve p53 Kodon 72 Polimorfizmi Arasındaki İlişki

Karsinogenezde rol oynayan bazı genlerin germline polimorfizmleri, HPV-ilişkili karsinomlar için genetik yatkınlık oluşturabilmektedir (43). p53 tümör supressör geninin 72. kodonundaki yaygın bir polimorfizmin, HPV-ilişkili kanserlerin gelişiminde bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmektedir. p53'ün ekzon 4 kodon 72'deki bu polimorfizminin HPV-ilişkili kanserlerin gelişiminde rol oynadığı ilk olarak 1998 yılında Storey ve ark. tarafından ileri sürülmüştür (67). Araştırmacılar HPV-teşvikli servikal kanserli kadınların büyük bir kısmının (%76) Arg alleli için homozigot olduğunu rapor etmişlerdir. Buna göre Arg72 için homozigot olan kadınlarda 7 kat artmış servikal kanser geliştirme riski olduğunu rapor etmişlerdir.

Yüksek-risk HPV ekspresse eden hücrelerde p53 seviyesi enfekte olmayan normal hücrelerle karşılaştırıldığında düşüktür. p53 mRNA seviyesi etkilenmemektedir fakat p53 proteininin yarı ömrü azalmaktadır. Bu yüzden yüksek-risk HPV'ler p53 TS proteininin proteolitik degradasyonunu hızlandırarak onu inaktive etme stratejisi geliştirmişlerdir (52).

Düşük risk HPV-11'in E6 proteini bile p53 Arg formunu degrade edebilmektedir. Özellikle homozigot Arg alleli HPV-ilişkili servikal kanserlerin %77'sinde tespit edilmiştir. Bu oran normal popülasyonda %37 olarak bulunmuştur. E6 tarafından p53 Arg'nin daha hızlı degradasyonu, artmış hücrel mutasyon oranıyla ve genomik instabiliteyle sonuçlanacaktır. p53 Pro ise degradasyona daha dirençli olup bu sayede sonraki genetik hasarlardan hücreyi

koruyacaktır. Eğer tüm risk faktörleri eşitse p53 Arg alleli, malign değişim için 7 kat artmış yüksek risk oluşturmaktadır (17).

p53'ün wild tip allel formu, HPV infeksiyonunu takiben E6 onko-proteini tarafından degradasyona Pro72 varyantından daha hassastır. Ayrıca hücre sel apoptozisi tetiklemede wild form daha etkilidir (21). Çeşitli çalışmalarda R72 varyantının, apoptozisi indüklemeye önemli derecede artmış bir yeteneğe sahip olduğu ve bunun da özellikle mitokondriyle olan ilişkisinden kaynaklandığı bulunmuştur. R72 ve P72 proteinlerinin biyolojik aktivitelerindeki farklılıklar ayrıca p53'ün mutant formlarını içeren belirli tümörlerde de tanımlanmıştır. Kodon 72 polimorfizmi için heterozigot (R72/P72) olan bireylerden elde edilen tümörlerde R72 alleli mutasyona daha çok maruz kalırken P72 alleli çoğunlukla delesyonla kaybedilmektedir (57). Kawaguchi ve ark. HPV-16/18 pozitif olan örneklerde Arg taşıyan p53 protein formunun E6 proteini tarafından degradasyona HPV-16/18 negatif örneklerden daha yatkın olduğunu bulmuşlardır (34).

3.7. Çalışmanın Amacı

Kolorektal kanser ve mide kanseri tüm dünyada en yaygın malignansilerden biridir (76, 79). Kolorektal kanser gelişiminde önemli olan genetik faktörler, TS genler olarak adlandırılan hücre regülasyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında görevli genlerdir (24). Özellikle p53 mutasyonları mide kanserinde oldukça sık görülmektedir (48).

Bir çok solid kanser önemli genetik komponentle birlikte multifaktöriyel olarak düşünülmektedir. Bireyler arasında hastalığa yatkınlık, hastalığın ciddiyeti,

tedaviye cevap, ciddi komplikasyonların oluşması ve diğer olası sonuçlar açısından farklılıklar söz konusudur. Kanserde SNP'lerin populasyon asosiyasyon çalışmaları hastalık riski, ciddiyeti, tedaviye cevap ve yan etkileri önceden tahmin etmek ve uygun danışmanlık verilmek açısından oldukça önemlidir (6).

Bazı p53 polimorfizmlerinin çeşitli insan kanserlerine yatkınlıkla ve prognozla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. p53'ün yaygın bir polimorfizmi, kodon 72'de gerçekleşmektedir. Bu polimorfizm ya bir prolin (CCC) ya da bir arginin residüsü (CGC) içeren varyant bir proteinle sonuçlanmaktadır. p53 varyantlarının, transkripsiyonu aktive etmek, apoptozu indüklemek ve primer hücrelerin transkripsiyonunu baskılamak için transkripsiyonel sistemin komponentlerine bağlanma yeteneklerinde farklılıklar söz konusudur. Pro/Pro genotipli hastalar diğer genotiplere sahip olanlara göre (özellikle sigara içen hastalar) akciğer kanseri gelişimine daha yatkındır. Meme kanseri olan hastalarda artmış prolin alleli frekansı (Pro/Pro veya Arg/Pro genotipleri) bulunmuştur (81). p53 kodon 72 polimorfizminin Arg ve Pro allelleri farklı mekanizmalar yoluyla farklı kanserlerde yükselmiş risklere neden olabilir (69). Çeşitli çalışmalar kodon 72 polimorfizminin mide adenokarsinom gelişiminde rol oynadığını öne sürmektedir (81). Ancak mide kanseri ve p53 polimorfizmiyle ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (82). p53'ün 2 polimorfik formu arasındaki farklılıkları ortaya koyan deneysel çalışmalara göre kodon 72'deki genotip kolorektal tümör gelişimine yatkınlığı değiştirebilir (38).

Kanser gelişiminde eukaryotik virüslerin olası rolü ise son 50 yıldır yoğun bir araştırma alanı haline gelmiştir. Çeşitli kanserler ve bazı DNA ve RNA

virüsleri arasında güçlü bir ilişki saptanmıştır (58). Karsinogenezde rol oynayan önemli DNA tümör virüslerinden biri HPV'dir (39). Yüksek-riskli HPV'ler ile enfeksiyon sonucunda normal hücrelerin DNA hasarına cevabı bozulabilmektedir (35). HPV'nin onkogenik potansiyelinin özellikle 2 erken viral gen ürünü olan E6 ve E7 ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Bu proteinler, TS genler tarafından kodlanan proteinlerle etkileşirler (39). Çalışmalar, birkaç DNA tümör virüsünün transforme edici proteinlerinin özellikle p53 proteini ile etkileştiğini göstermektedir (41). p53 TS geninin kodon 72 polimorfizminin, HPV-ilişkili kanserlerin gelişiminde bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmektedir (67). Son zamanlarda HPV içeren viral karsinogenezde, konakçının genetik alt yapısının bir kofaktör olarak etki ettiği moleküler bir temel tanımlanmıştır. Buna göre insan p53 geninin kodon 72 Arg formu, HPV E6 tarafından degradasyona Pro formundan daha hassastır (14).

HPV enfeksiyonu ile servikal ve anogenital tümörler arasındaki ilişki yaygın olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte HPV ile üst solunum sindirim sistemi ve meme dokusu gibi çeşitli vücut bölgelerini içeren malignant hastalıklar arasındaki ilişki henüz açık değildir (15).

Farklı popülasyonlarda kolorektal doku ve adenokarsinomlarda HPV DNA rapor edilmişse de HPV ile birlikte p53 kodon 72 polimorfizmi sadece birkaç çalışmada araştırılmıştır (55). Ayrıca hem HPV insidansının coğrafik bölgelere göre farklılık göstermesi hem de p53 kodon 72 polimorfizminin etnik gruplar arasında önemli bir farklılık göstermesi sebebiyle, bu çalışma ile Elazığ ili ve

çevresinde gastrointestinal sistem kanserlerinin oluşumunda HPV ve p53 kodon 72 polimorfizminin bir rolü olup olmadığının araştırılması amacıyla planlandı.

Bu çalışmada gastrointestinal sistemin özofagus, mide, kolon ve rektum gibi farklı lokalizasyonlarını içeren tümörlerde çalışıldı. HPV tespiti için PCR yöntemi altın standart olarak kabul edildiği için dokulardan elde edilen DNA'larda PCR yöntemiyle HPV tespiti yapılması amaçlandı. p53 kodon 72 polimorfizminin tespiti için ise allel spesifik PCR kullanılarak genotipler belirlendi ve gastrointestinal sistemin farklı lokalizasyonlarını içeren tümörlerde HPV'nin farklı tipleri ile p53 kodon 72 polimorfizmi arasındaki ilişki değerlendirildi.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Hastaların Seçimi

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulunca onaylanan çalışmada, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2000-2006 yılları arasında patolojik olarak gastrointestinal sistem adenokarsinom tanısı almış 106 hastaya ait tümör örnekleri ve aynı 106 hastanın tümöre komşu olan normal dokusu kullanıldı. Kanser vakalarının 38'i mide, 42'si kolon, 20'si rektum, 4'ü özofagus ve 2'si ince barsak tümörüdür. Her lokalizasyona ait tümörün histolojik tipleri tablo 1'de verilmiştir. Hem tümör dokusu hem komşu normal dokuda p53 kodon 72 polimorfizmi ve HPV çalışıldı. Genomik DNA izolasyonu tümör dokusu ve komşu normal dokuyu içeren parafine gömülü dokulardan elde edilen kesitlerden gerçekleştirildi. Vaka grubunu oluşturan bu hastaların cinsiyet dağılımı 59 erkek ve 47 kadın, yaş ortalaması 57.03 ± 1.29 (25-80 arası) olarak belirlendi.

p53 kodon 72 polimorfizminin araştırılmasında kontrol grubu olarak kanser olmayan 107 sağlıklı bireyin kan örneklerinden elde edilen DNA kullanıldı. Sağlıklı kontrol grubunun cinsiyet dağılımı 71 erkek ve 36 kadın, yaş ortalamaları 36.03 ± 1.51 (17-78 arası) olarak belirlendi.

Tablo 1: Hastalarda tümör lokalizasyonuna göre tümörün histolojik tipleri

| | Mide | Kolon | Rektum | Özofagus | İnce bağırsak |
|---------------------------------|------|-------|--------|----------|---------------|
| İyi diferansiye adenokarsinom | 2 | 5 | 2 | - | - |
| Orta diferansiye adenokarsinom | 13 | 27 | 15 | 2 | 2 |
| Az diferansiye adenokarsinom | 10 | 5 | - | 1 | - |
| Karsinoid tümör | 1 | - | - | - | - |
| Taşlı yüzük hücreli karsinom | 4 | - | - | - | - |
| Müsinöz karsinom | 3 | 3 | 3 | - | - |
| Diffüz large B hücreli karsinom | 2 | - | - | - | - |
| Adenoskuamöz karsinom | 1 | 2 | - | 1 | - |
| Difüz infiltratif karsinom | 2 | - | - | - | - |
| Toplam | 38 | 42 | 20 | 4 | 2 |

4.2 Örneklerin toplanması ve analize hazırlanması

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2000-2006 yıllarına ait arşiv taraması yapılarak gastrointestinal sistemin özofagus, mide, kolon, ince barsak ve rektum bölgelerini içeren adenokarsinomlu hastalar tespit edildi. Yeterli DNA elde edebilmek için bu hastalardan ilgili bölge rezeksiyonu yapılanlar çalışmaya dahil edildi. Bu hastalara ait histolojik preparatlar mikroskop altında incelenerek tümör dokusu ve normal doku örneği içeren preparatlar ve daha sonra bunlara ait parafin bloklar elde edildi. Parafine gömülü dokulardan 5 µm'lik kesitler alınarak ependorf tüplerde saklandı. Örnek toplanması tamamlandıktan sonra DNA izolasyonu aşamasına geçildi.

Kanser olmayan sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunda ise 2 ml periferik kan EDTA'lı tüplere alınarak DNA izolasyonu yapılmaya kadar -20 C°'de saklandı.

4.3. Kimyasal maddeler, sarf malzemeleri ve cihazlar

Mikrosantrifüj (Ole Dich Instrumentmakers APS, type 157.MP, Germany ve Eppendorf microcentrifuge type 5415C, Germany), Elektronik hassas terazi (Shimadzu Corporation Libror AEG-320, Japan), pH metre (Hanna Instruments HI8521 pHmeter, Italy), UV/visible spektrofotometre (LKB Biochrom Ultraspec Plus 4054 UV/visible spectrophotometer, Cambridge, England), hız ayarlı vorteks (Labinco L46, The Netherlands), su banyosu (Kötterman labortechnik type 3643, Germany), Elektroforez aparatı 1200V-500mA E815 (Belgium), Electrophoresis box (Consort N.V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belgium), Eppendorf Mastercycler gradient (Netheler Mlnz GmbH, 22331 Hamburg, Germany), UV lambası ve ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi (TCP-20-M, Vilber Lourmat, Cedex, France), sodyum asetat, sodyum klorür, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, glasiyal asetik asit, DTT (dithiotreitol) (Ambresco, Solon, USA), proteaz (Sigma, Germany), amonyum klorür, potasyum hidrojen karbonat, sodyum dodesil sülfat (SDS), kloroform izoamil alkol (25:24:1) (Ambresco, Solon, USA), kloroform izoamil alkol (24:1) (Ambresco, Solon, USA), %70'lik etanol, borik asit, EDTA, bromphenol blue, xylene cyanole, ficoll, agaroz, yüksek rezolüsyonlu agaroz, ethidium bromide, TRIS HCl, potasyum asetat, magnesium asetat, TRIS-asetat, deoksinükleotid trifosfat (dNTP) seti (dATP, dGTP, dCTP,

dTTP) (Larova, Germany), Taq DNA polimeraz (Sigma, Germany), Magnezyum Klorür, 100 bç DNA marker (Bio Basic, Canada).

4.4 Parafin blok kesitlerinden DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonların hazırlanması

4.4.1 K tamponunun hazırlanması

Stok solüsyonu

1 M Tris-HCl: 15.764 gr Tris-HCl tartılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. pH'ı 0.1 N HCl ile 8'e ayarlandı.

5 M NaCl: 29.22 gr NaCl tartılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

0.5 M EDTA: 18.61 gr EDTA tartılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözme işlemi esnasında içine yaklaşık olarak 2-3 gr NaOH pelleti atıldı. pH 8'e ayarlandı.

%4'lük SDS: 4 gr SDS tartılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Çalışma solüsyonu

20 mM Tris-HCl pH:8: 1 M'lık stok Tris-HCl solüsyonundan 10 ml alındı.

150 mM NaCl: 5 M'lık stok NaCl solüsyonundan 15 ml alındı.

10 mM EDTA pH:8: 0.5 M'lık stok EDTA solüsyonundan 10 ml alındı.

%0.2'lik SDS: %4'lük stok SDS solüsyonundan 25 ml alındı.

Proteinaz K: 10 mg proteinaz K tartıldı.

K tamponu hazırlanırken çalışma solüsyonlarından belirtilen oranlarda alınarak solüsyonun hacmi distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda yarım saat oda ısısında karıştırıldı. Steril kabin içerisinde 14 ml'lik falkon tüplerine 12 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve -20°C 'de saklandı.

4.4.2. DTT'nin hazırlanması

1 M'lık 10 ml stok DTT hazırlamak için 1.5425 gr DTT tartılarak steril bir falkon tüpüne konuldu ve distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Tüp alt-üst edilerek erimesi sağlandı. Steril kabin içerisinde 1.5 ml'lik ependorf tüplere 500 μl olarak dağıtılarak -20°C 'de saklandı ve çalışma esnasında her örnek için bundan 40 mM kullanıldı.

4.4.3. Sodyum asetat'ın hazırlanması

3 M'lık sodyum asetat için 40.81 gr sodyum asetat tartıldı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Glasiyal asetik asit kullanılarak pH 5.2'ye ayarlandı.

4.5. Parafin blok kesitlerinden DNA izolasyonu

Parafin blok kesitlerinden DNA izolasyonu Kalkan ve arkadaşlarının protokolüne göre uygulandı (33). Gerçekleştirilen deney aşamaları aşağıda sıralandığı gibidir:

1. Patoloji Anabilim Dalında, parafine gömülü dokulardan 5 μm olarak alınan kesitlerden 1-2 tanesi alınarak ependorf tüpe bırakıldı.
2. Üzerine 500 μl K tamponu ve 20 μl DTT konularak vortekslendi.

3. 37°C ve yaklaşık olarak 85 rpm çalkalanma olarak ayarlanmış su banyosunda bir gece bekletildi.
4. Ertesi gün üzerine 500 µl fenol kloroform izoamil alkol (25:24:1) eklenerek vortekslendi ve 15 dakika 13.000 rpm'de +4°C'de santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası üst katmandaki süpernatant pipetle alınarak ayrı bir ependorfa toplandı.
6. Üzerine, alınan süpernatanta eşit hacimde kloroform izoamil alkol (24:1) eklendi.
7. Hafif vortekslendikten sonra 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
8. Süpernatant tekrar alınarak ayrı bir ependorfa aktarıldı.
9. Alınan süpernatantın 1/10'i kadar sodyum asetat eklenerek pipetaj yapıldı.
10. Üzerine, alınan süpernatantın 2.5 katı kadar -20°C'deki absolute etonolden eklenerek hafifçe vortekslendi ve -20°C'de 1 gece (ya da -80°C'de 2 saat) bekletildi.
11. Üçüncü gün -20°C'den alınarak oda ısısında 5-10 dakika bekletildi.
12. 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
13. DNA ependorfun dip kısmında açık renkli bir pellet olarak gözlendi.
14. Tüp hafifçe eğilerek süpernatant döküldü.
15. Üzerine 800 µl %70'lik etil alkol konularak hafifçe vortekslendi ve 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
16. Süpernatant döküldü ve 2-3 saat kurumaya bırakıldı.

17. Tüplere 60 µl DNase ve RNase'dan arındırılmış deiyonize su ilave edilerek sulandırıldı.

18. DNA'lar kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Bu işlemler bittikten sonra eppendorf tüplerde bulunan DNA'nın tahmini miktarını hesaplamak için spektrofotometre ile ölçüm yapıldı. UV/visible spektrometre 260 ve 280 nm'de çift dalga boyu aralığında okuma yapacak şekilde ayarlandı. DNA örneğinden 4 µl alınarak mikro küvette bulunan 746 µl saf suyun üzerine konuldu ve alt-üst yapıldı. Okuma gerçekleştirildi. Daha sonra $\text{ng}/\mu\text{l}$ DNA = $A_{260} \times \text{dilasyon faktörü} \times 50$ formülünden hareketle örneklerdeki DNA'nın yaklaşık miktarı hesaplandı (59).

4.6. Kandan DNA izolasyonu

Kandan DNA izolasyonu Promega firmasından alınan ticari "Wizard Genomic DNA Purification Kit"i ile gerçekleştirildi (Kat. No: A1125, Madison, WI, USA). Bu kit 300 µl kandan DNA izolasyonu için dizayn edilmiştir. Çalışma esnasında kitin genel kurallarına uymak koşuluyla bazı modifikasyonlar yapıldı.

4.7. Oligonükleotidler (primerler)

Çalışmada kullanılacak olan primerler (Oligonükleotid) Iontek firmasına sentezletirildi. Satın alınan primerlerin nükleotid dizisi ve elde edilen PCR ürününü baz çifti uzunluğu aşağıda belirtilmiştir:

Tablo 2: Kullanılan primerlerin dizileri ve PCR ürün uzunlukları

| Primerler | Dizi (5'– 3') | PCR ürünü (bp) |
|-------------------|---|----------------|
| β -globin F | GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC | 268 |
| β -globin R | CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC | |
| GP5 | TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC | 139-145 |
| GP6 | GAA AAA TAA ACT GTA AAT CA | |
| HPV18F | AAA CTA ACT AAC ACT GGG TTA TAC A | 143 |
| HPV18R | ATG GCA CTG GCC TCT ATA GT | |
| HPV16F | TCG ATG TAT GTC TTG TTG CAG | 225 |
| HPV16R | GGT TAC AAT ATT GTA ATG GGC | |
| HPV11F | TGT GTG GCG AGA CAA CTT TCC CTT | 236 |
| HPV11R | TGG TTA TTT AGT TTT ATG AAG CGT GCC TTT CCC | |
| HPV33F | AAC AGT TAA AAA ACC TTT AAA | 171 |
| HPV33R | AGT TTC TCT ACG TCG GGA CCT C | |
| ArgF | TCC CCC TTG CCG TCC CAA | 141 |
| ArgR | CTG GTG CAG GGG CCA CGC | |
| ProF | GCC AGA GGC TGC TCC CCC | 177 |
| ProR | CGT GCA AGT CAC AGA CTT | |

PCR işleminde kullanılacak olan tüm primerlerin konsantrasyonunun 25 μ l PCR son hacmi için 20 pmol olarak hazırlandı.

4.8. Polimeraz zincir reaksiyonu

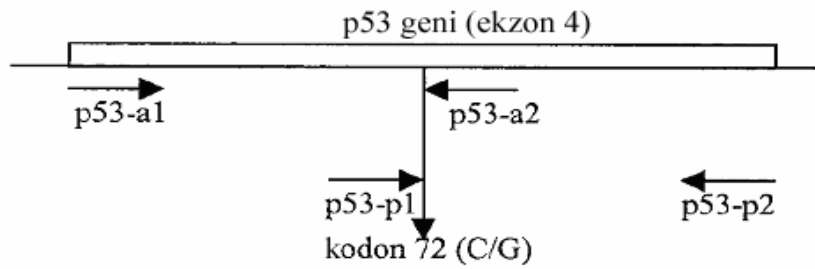
4.8.1. Beta globin spesifik PCR

Yüz altı tümör ve 106 komşu normal dokuya ait parafine gömülü doku kesitlerinden elde edilen tüm DNA'lar ilk olarak beta (β)-globin primerleriyle PCR kurularak (73) DNA'nın varlığı kontrol edildi. β -globin PCR koşulları şu şekildedir: her bir primerden 20 pmol kullanıldı. Sense ve antisense primerler, 1.25 U *Taq* DNA polimeraz (Sigma, Germany), 2 mM dNTP (Larova, Germany), 1 mM $MgCl_2$, 6.5 μ l ddH₂O ve 50 mM KCl ile 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) tamponu (10X buffer) içeren master miks solusyonu (15 μ L), içinde 50 ng DNA

içeren 0.2 mL'lik tüplere eklendi. PCR işleminin birinci aşaması çift sarmal DNA moleküllerini denatüre etmek için yalnızca bir döngü olmak üzere 5 dakika 94°C'de gerçekleştirildi. PCR işleminin ikinci aşaması 94°C'de 30 saniye denatürasyon (melting), 52°C'de 1 dakika bağlanma (annealing) ve 72°C'de 1 dakika uzatma (extention) olmak üzere 40 döngü üzerinden gerçekleştirildi. Üçüncü aşama olan en son siklustaki uzatma periyodu 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi ve örnekler 4°C'ye kadar hızla soğutuldu. Daha sonra bu PCR amplikonları %2'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

4.8.2. p53 kodon 72 spesifik PCR

β -globin PCR'ı ile beklenen bant boyutunda DNA'nın varlığı gözlenmeyen örnekler için parafin blok kesitlerinden DNA izolasyonu tekrar gerçekleştirildi. β -globin spesifik PCR ile tüm örneklerde DNA'nın varlığı gösterildikten sonra p53 kodon 72 polimorfizmini tespit etmek için allel spesifik PCR (66) uygulandı (Şekil 3).



Şekil 3: Allel spesifik PCR ile p53 kodon 72 polimorfizminin belirlenmesi. Ekzon 4'de polimorfik bölgenin yapısı ve PCR analizi için kullanılan primerler oklarla gösterilmiştir (43. kaynaktan modifiye edilmiştir).

p53 kodon 72 polimorfizmini belirlemek için uygulanan PCR koşulları şu şekildedir: sense ve antisense primerler, 1.25 U *Taq* DNA polimeraz, 2 mM dNTP, 1 mM MgCl₂, 9 µl ddH₂O ve 50 mM KCl ile 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) tamponu (10X buffer) içeren master miks solusyonu (20 µL), içinde 50 ng DNA içeren 0.2 ml'lik tüplere eklendi. Her örnek için p53 arginin (Arg) ve prolin (Pro) allellere özgü olmak üzere iki ayrı PCR reaksiyonu kuruldu. Bunun için; yalnızca bir döngü olmak üzere 94°C'de 3 dakika, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, Arg alleli için 60°C'de 30 saniye ve Pro alleli için 54°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 30 saniye uzatma olmak üzere 35 döngü üzerinden gerçekleştirildi. Uzatma periyodu 72°C'de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi ve örnekler 4°C'ye kadar hızla soğutuldu. Daha sonra bu PCR amplikonları %2'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

4.8.3. HPV spesifik PCR

HPV spesifik PCR kurulmadan önce hangi örneklerde HPV'nin olduğunu araştırmak amacıyla öncelikle genel dizi olan GP5/GP6 genel primerleri kullanılarak PCR kuruldu (66). Bunun için sense ve antisense primerler, 1.25 U *Taq* DNA polimeraz, 2 mM dNTP, 1 mM MgCl₂, 7 µl ddH₂O ve 50 mM KCl ile 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) tamponu (10X buffer) içeren master miks solusyonu (20 µl), içinde 50 ng DNA içeren 0.2 ml'lik tüplere eklendi. PCR koşulları 94°C'de 3 dakika, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 30 saniye uzatma olmak üzere 40 döngü üzerinden gerçekleştirildi. Uzatma periyodu 72°C'de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi ve örnekler

4°C'ye kadar hızla soğutuldu. Daha sonra bu PCR amplikonları %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek hangi örneklerde HPV enfeksiyonunun olduğu analiz edildi.

Agaroz jel elektroforezi sonucunda beklenildiği gibi 145 bç (baz çifti) uzunluğunda bant gözlenen örnekler HPV enfeksiyonu yönünden pozitif olarak değerlendirildi. Bu şekilde GP5/GP6 spesifik PCR ile HPV-pozitif olarak tespit edilen örneklere HPV-11, 16, 18 ve 33 tiplerine ait primerler kullanılarak 2 ayrı reaksiyon tüpü içerisinde PCR kurularak HPV tiplemesi yapıldı (66). HPV-16 ve 33 birlikte, HPV-11 ve 18 birlikte çalışıldı. HPV-16 için spesifik primer dizisi daha önce iyi çalıştığı bilinen farklı bir makaleden alındı (1). HPV-11 ve 18, HPV-16 ve 33'e ait 20 pmol olarak hazırlanmış 2 primer çiftine ait sense ve antisense primerler, 1.25 U *Taq* DNA polimeraz, 2 mM dNTP, 1 mM MgCl₂, 8 µl ddH₂O ve 50 mM KCl ile 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) tamponu (10X buffer) içeren master miks solusyonu (25 µl), içinde 50 ng DNA içeren 0.2 ml'lik tüplere eklendi. PCR koşulları 94°C'de 2 dakika, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 40 saniye bağlanma ve 72°C'de 35 saniye uzatma olmak üzere 10 döngü ve 92°C'de 30 saniye denatürasyon, 47°C'de 40 saniye bağlanma ve 72°C'de 45 saniye uzatma olmak üzere 30 döngü üzerinden gerçekleştirildi. Uzatma periyodu 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi ve örnekler 4°C'ye kadar hızla soğutuldu. Daha sonra bu PCR amplikonları %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek HPV tiplerine özgü bant boyutlarına göre HPV tiplemesi yapıldı.

4.9. Agaroz jel elektroforezi

Beta globin, p53 kodon 72, GP5/GP6 ve HPV tiplmesi için kurulan tüm PCR reaksiyon ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütüldü (59). Koşma tamponu olarak Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu (0.5X) kullanıldı. Bu tamponun stok şekli olan 5X tampon şu şekilde hazırlandı: 54 g TRIS-base, 27.5 gr borik asit, 20 mL 0.5 M EDTA (pH 8) 1 L distile ve deiyonize suda çözüldü. Jel elektroforezini yapmak için horizontal tipte jel elektroforez sistemi kullanıldı (Electrophoresis box, Consort N.V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belgium). UV ışığında DNA fragmanlarını görmek için ethidium bromide floresan boyası kullanıldı. Her 100 ml 0.5X TBE tamponu için, 5 µl hacimde, konsantrasyonu 10 mg/ml olan EtBr ilave edildi (Jeldeki ve koşma tamponundaki final EtBr konsantrasyonu 0.5 µg/ml olarak belirlendi). Jel üzerindeki kuyucuklara DNA'nın aplikasyonu için yükleme tamponu kullanıldı (%15 ficoll, %0.25 BPB [brom phenol blue], %0.25 XC [xylene cyanole] 100 ml su içerisinde çözüldü, 3'er ml'lik hacimlere ayrılarak deneylerde kullanıldı). Bu yükleme tamponunun oranı, jele yüklenecek PCR ürünününün %10'unu geçmeyecek şekilde ayarlandı. Bunun için sindirim yapılmış DNA ürününe (total 25 µl) 2.5 µl boyalı tampon ilave edildi. DNA'lar jellere yüklenirken, beklenen bantların boyutlarının belirlenebilmesi amacıyla aynı jel üzerine Promega firmasından (Madison, WI, USA) alınan 100 bp DNA marker'i de yüklendi. Jeller, oda sıcaklığında 150 V ve 75 mAmp sabit akımda koşturuldu. 30 dakikalık koşturmadan sonra jeller UV ışık altında değerlendirilerek fotoğraflandı.

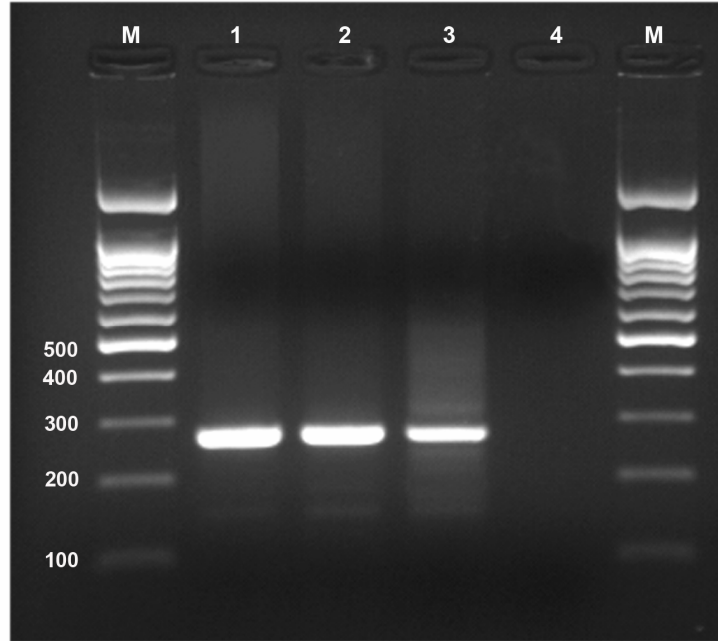
4.10. İstatistiksel analizler

Hastaların demografik özellikleri arasındaki farklılıklar (yaş, cinsiyet), p53 kodon 72 polimorfizmi göz önüne alınarak Ki-kare testi ile değerlendirildi. Hastalar ve kontroller arasındaki genotipik dağılımların farklılıkları ve bunun HPV ile olan ilişkisi Ki-kare testi ile değerlendirildi. P değerinin <0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Bütün istatistiksel testler “SPSS® for Windows computing program, Version 11.0” ile gerçekleştirildi.

5. BULGULAR

5.1. Parafin Blok Kesitlerinde Beta-Globin PCR sonuçları

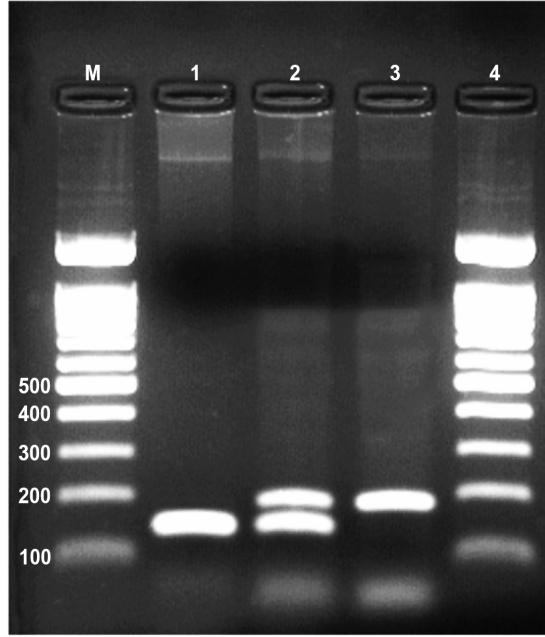
Çalışmanın ilk aşamasında 106 tümör dokusu ve bu tümörlere komşu normal doku olmak üzere toplam 212 parafin blok kesitinden DNA izolasyonu yapıldı ve beta-globin primerleriyle PCR kuruldu. Hücresel DNA'nın varlığına bakılarak ekstraksiyonun başarısı kontrol edildi. DNA elde edilen örneklerin PCR'ları sonucunda agaroz jel elektroforezinde 268 bç uzunluğundaki ürünü gösteren bant gözlemlendi (Şekil 4). Bu bantın gözlenmediği örnekler için parafin blok kesitlerinden tekrar DNA izolasyonu yapılarak beta-globin PCR'ı uygulandı.



Şekil 4: Beta-globin spesifik PCR'a yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1, 2 ve 3. sütunlar: 268 bç bant elde edilen örnekler. 4. sütun: negatif kontrol. M: 100 bç DNA boyut markırı.

5.2. Hasta ve Kontrollerde p53 Kodon 72 Polimorfizminin Dağılımı

Önce tümör dokusu ve tümöre komşu normal doku örneklerinden elde edilen DNA'larda, sonra sağlıklı bireylerin periferik kanlarından elde edilen DNA'larda p53 kodon 72 polimorfizmi çalışıldı. Bunun için 2 ayrı deney ile allel spesifik PCR uygulandı. Agaroz jel elektroforezinde Arg alleli için 141 bç, Pro alleli için ise 177 bç uzunlukta bantlar elde edildi. Sadece 141 bç uzunlukta bant olması halinde Arg/Arg homozigot, sadece 177 bç'lik bant varlığında Pro/Pro homozigot, hem 141 bç hem 177 bç uzunluklarında bant gözleendiğine Arg/Pro heterozigot olarak değerlendirildi (Şekil 5).



Şekil 5: p53 kodon 72 polimorfizmine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1.birey: Arg homozigot. 2. birey: Arg/Pro heterozigot, 3. birey: Pro/Pro homozigot. Arg alleli 141 bç, Pro alleli 177 bç. M: 100 bç DNA boyut markırı.

Hasta ve kontrol grubundaki p53 kodon 72 polimorfizmine ait genotip sıklıkları tablo 3'de verilmiştir. İki grup arasındaki genotipler değerlendirilirken, bir bireyin tüm vücut hücrelerindeki genotipi yansıması açısından adenokarsinom

tanılı hastaların tümöre komşu olan normal dokularındaki p53 genotipi dikkate alındı ve bunlar sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubundaki p53 genotipleriyle karşılaştırıldı. Tümör dokusundaki p53 genotipi ayrıca değerlendirilmeye alındı.

Tablo 3: Hasta ve kontrol grubunda p53 kodon 72 polimorfizmine ait genotip sıklıkları (%)

| | Arg/Pro (%) | Arg/Arg (%) | Pro/Pro (%) | p |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|----|
| Hasta (n = 106) | 94 (88.7) | 12 (11.3) | - | ** |
| Kontrol (n = 107) | 50 (46.7) | 49 (45.8) | 8 (7.5) | — |
| p | | ** | | |

— : p>0.05

** : p<0.01

Bu sonuçlara göre hasta grubunda Arg/Pro genotipi 94 bireyde (%88.7), Arg/Arg genotipi 12 bireyde (%11.3) tespit edilirken Pro/Pro genotipi hiç gözlenmedi. Kontrol grubunda ise Arg/Pro genotipi 50 bireyde (%46.7), Arg/Arg genotipi 49 bireyde (%45.8) ve Pro/Pro genotipi 8 bireyde (%7.5) tespit edildi. Hasta ve kontroller arasında Arg/Pro, Arg/Arg ve Pro/Pro genotiplerinin dağılımında istatistiki olarak önemli bir fark olduğu tespit edildi (p<0.01). Hastalarda Arg/Pro genotipinin (94/106) kontrol grubuna (50/107) göre önemli derecede yüksek olduğu gözlemlendi. Hastalarda Arg/Arg genotipi (12/106) ise kontrol grubuna göre (49/107) önemli derecede düşüktü. Hastalarda Pro/Pro genotipi hiç gözlenmezken kontrol grubunda %7.5 (8/107) olarak tespit edildi. Ayrıca hasta grubunda Arg/Pro heterozigot genotipinin Arg/Arg homozigot genotipine oranla istatistiki olarak önemli bir farkla fazla olduğu gözlemlendi.

Hasta ve kontrol grubunda Arg ve Pro allel frekansları tablo 4’de verilmiştir. Buna göre Arg allel frekansı hastalarda 0.556, kontrollerde 0.691 ve

Pro allel frekansı hastalarda 0.691, kontrollerde 0.308'dir. Hasta ve kontrol grupları arasında Arg ve Pro allel frekansları açısından istatistiki olarak önemli bir fark olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). Hasta grubunda Pro allel frekansı kontrol grubuna göre yüksek olarak bulundu. Ayrıca kontrol grubunun kendi içerisinde Arg allel frekansı Pro allel frekansına göre önemli derecede yüksek olarak belirlendi ($p<0.01$).

Tablo 4: Hasta ve kontrol grubundaki p53 kodon 72 polimorfizmine ait Arg ve Pro allel frekansları (%)

| | Arg allel frekansı (%) | Pro allel frekansı (%) | p |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----|
| Hasta (n = 106) | 59 (0.556) | 47 (0.443) | — |
| Kontrol (n = 107) | 74 (0.691) | 33 (0.308) | ** |
| | p | * | |

— : $p>0.05$

** : $p<0.01$

*: $p<0.05$

Bu çalışmada p53 kodon 72 polimorfizmi değerlendirilirken hastaların tümöre komşu olan normal dokusundaki genotip esas alındı. Ancak tümör dokusu da ayrıca p53 kodon 72 polimorfizmi açısından değerlendirildi. Çalışılan 106 tümör dokusu örneğinin 80'indeki p53 genotipi komşu normal dokuyla aynı olarak bulundu. Kalan 26 örnekte ise normal dokudan farklı genotipler tespit edildi. Bunlar; 18 örnekte komşu normal dokudaki p53 genotipi Arg/Pro iken tümör dokusunda Arg/Arg şeklinde ve 8 örnekte ise normal dokudaki genotip Arg/Arg iken tümör dokusunda Arg/Pro şeklindedir.

5.3. Hasta ve Kontrol Grubunda Cinsiyete Göre p53 Kodon 72

Polimorfizminin Dağılımı

Cinsiyete göre hasta ve kontrol grubunda p53 genotiplerinin dağılımına bakıldığında hasta grubunda Arg/Pro ve Arg/Arg genotiplerinin kadın ve erkeklerdeki dağılımında önemli bir fark gözlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 5). Ancak hasta grubunda hem erkeklerde hem de kadınlarda Arg/Pro genotipi Arg/Arg genotipine göre istatistiki olarak önemli düzeyde yüksek olarak belirlendi ($p<0.01$). Aynı şekilde kontrol grubunda da erkek ve kadınlarda Arg/Pro, Arg/Arg ve Pro/Pro genotiplerinin dağılımında fark gözlenmedi ($p>0.05$).

Tablo 5: Cinsiyete göre hasta ve kontrol grubunda p53 genotipinin dağılımı (%)

| | Arg/Pro (%) | Arg/Arg (%) | Pro/Pro (%) | p |
|------------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|----|
| Hasta grubu (n = 106) | | | | |
| Erkek | 55 (51.9) | 4 (3.8) | - | ** |
| Kadın | 39 (36.8) | 8 (7.5) | - | ** |
| p | | — | | |
| Kontrol grubu (n=107) | | | | |
| Erkek | 35 (32.7) ^a | 31 (29.0) ^a | 5 (4.7) ^b | ** |
| Kadın | 15 (14.0) ^a | 18 (16.8) ^a | 3 (2.8) ^b | ** |
| p | | — | | |

—: $p>0.05$

** : $p<0.01$

a, b: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki farklılıklar önemlidir ($p<0.05$)

5.4. Hasta ve Kontrol Grubunda Yaşa Göre p53 Kodon 72

Polimorfizminin Dağılımı

Hasta ve kontrol grubunda yaşa göre p53 kodon 72 polimorfizmine ait genotip dağılımı tablo 6'da verilmiştir. Buna göre hem hasta hem kontrol grubunda Arg/Pro, Arg/Arg, Pro/Pro genotiplerinin dağılımında 60 yaş altında ve 60 yaş ve üstünde önemli bir farklılık olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). Sadece daha önce belirtildiği gibi her 2 grupta da hem 60 yaş altında hem de 60 yaş ve üstünde Arg/Pro heterozigot genotipi, Arg/Arg ve Pro/Pro genotiplerine göre önemli derecede yüksekti ($p<0.01$).

Tablo 6: Yaşa göre hasta ve kontrol grubunda p53 genotipinin dağılımı (%)

| | Arg/Pro (%) | Arg/Arg (%) | Pro/Pro (%) | p |
|------------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|----|
| Hasta grubu (n=106) | | | | |
| <60 yaş | 42 (41.6) | 7 (6.9) | — | ** |
| ≥60 yaş | 48 (47.5) | 4 (4.0) | — | ** |
| p | — | | | |
| Kontrol grubu (n=107) | | | | |
| <60 yaş | 44 (41.1) ^a | 40 (37.4) ^a | 7 (6.5) ^b | ** |
| ≥60 yaş | 6 (5.6) ^a | 9 (8.4) ^a | 1 (0.9) ^b | ** |
| p | — | | | |

—: $p>0.05$

** : $p<0.01$

a, b: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki farklılıklar önemlidir ($p<0.05$)

5.5. Hasta Grubunda Tümör Lokalizasyonuna Göre p53 Kodon 72 Polimorfizminin Dağılımı

Tablo 7’de hastalarda tümörün lokalizasyona göre p53 genotipinin dağılımı verilmiştir. Buna göre tüm lokalizasyonlarda Arg/Pro heterozigot genotip yüksek oranda tespit edilmiştir.

Tablo 7: Hasta grubunda tümör lokalizasyonuna göre p53 genotipinin dağılımı (%)

| | Arg/Pro (%) | Arg/Arg (%) |
|---------------------|-------------|-------------|
| Lokalizasyon | | |
| Mide | 33 (31.1) | 5 (4.7) |
| Kolon | 40 (37.7) | 2 (1.9) |
| Rektum | 16 (15.1) | 4 (3.8) |
| Özofagus | 3 (2.8) | 1 (0.9) |
| İnce Bağırsak | 2 (1.9) | - |
| Toplam | 94 (88.7) | 12 (11.3) |

5.6. Hasta Grubunda Tümörün Histolojik Tipine Göre p53 Kodon 72 Polimorfizminin Dağılımı

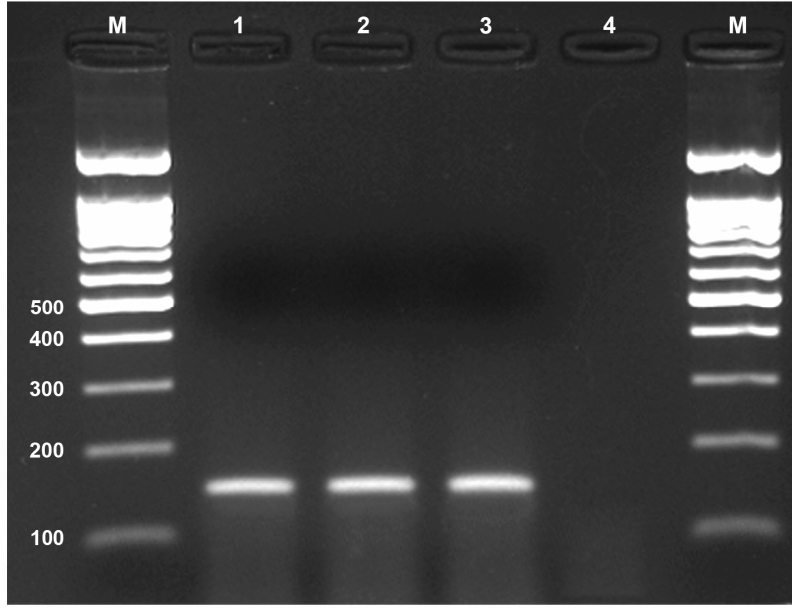
Hasta grubunda tümörün histolojik tipine göre p53 genotipinin dağılımı tablo 8’de verilmiştir. Hasta grubunun büyük bölümünde gözlenen orta derece diferansiye adenokarsinomlu hastaların 52’sinde (%49.1) Arg/Pro genotipi gözlemlendi.

Tablo 8: Hasta grubunda tümörün histolojik tipine göre p53 genotipinin dağılımı (%)

| | Arg/Pro (%) | Arg/Arg (%) |
|---------------------------------|-------------|-------------|
| Histolojik tip | | |
| İyi diferansiye adenokarsinom | 8 (7.5) | 1 (0.9) |
| Orta diferansiye adenokarsinom | 52 (49.1) | 7 (6.6) |
| Az diferansiye adenokarsinom | 13 (12.3) | 3 (2.8) |
| Karsinoid tümör | 1 (0.9) | - |
| Taşlı yüzük hücreli karsinom | 3 (2.8) | 1 (0.9) |
| Müsinöz karsinom | 9 (8.5) | - |
| Diffüz Large B hücreli karsinom | 2 (1.9) | - |
| Adenoskuamoz karsinom | 4 (3.8) | - |
| Difuz infiltratif karsinom | 2 (1.9) | - |

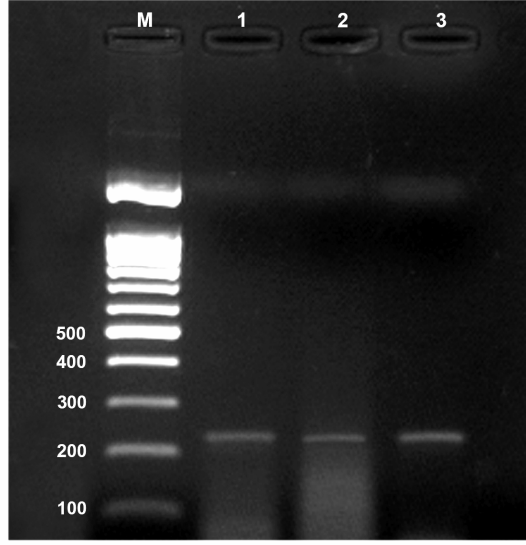
5.7. Hasta grubunda tümör dokusu ve tümöre komşu normal dokuda gözlenen HPV

p53 kodon 72 polimorfizmi çalışması tamamlandıktan sonra tümör dokusu ve tümöre komşu normal dokuda HPV tespiti için PCR çalışmaları yapıldı. HPV spesifik PCR kurulmadan önce hangi örneklerde HPV'nin olduğunu araştırmak amacıyla öncelikle genel dizi olan GP5/GP6 genel primerleri kullanılarak PCR kuruldu. HPV spesifik PCR 106 tümör dokusu örneğinin 100'ünde yapılabılırken, 106 komşu normal dokunun tümünde başarıyla gerçekleştirildi. GP5/GP6 spesifik PCR sonucunda agaroz jel elektroforezinde beklenildiği gibi 145 bp uzunluğunda bant gözlenen örnekler HPV enfeksiyonu bakımından pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 6). Buna göre çalışan 100 tümör dokusu örneğinin 41'i (%41) HPV (+), 59'u (%59) HPV (-) ve çalışan 106 tümöre komşu normal dokunun 33'ü (%31.1) HPV (+), 73'ü (%68.8) HPV (-) olarak tespit edildi.

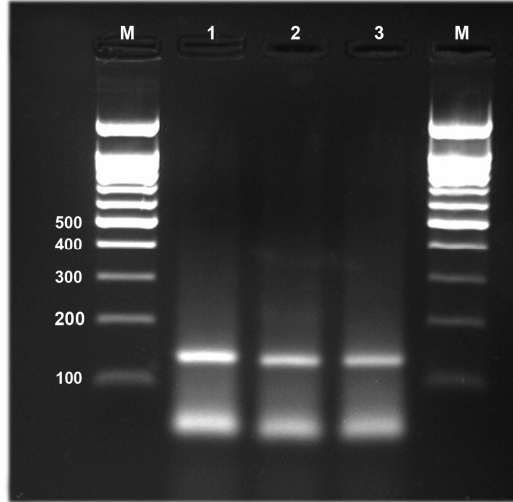


Şekil 6: GP5/GP6 spesifik PCR'a yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1, 2 ve 3. sütunlar: 145 bç bant elde edilen HPV (+) örnekler. 4. sütun: negatif kontrol. M: 100 bç DNA boyut markırı.

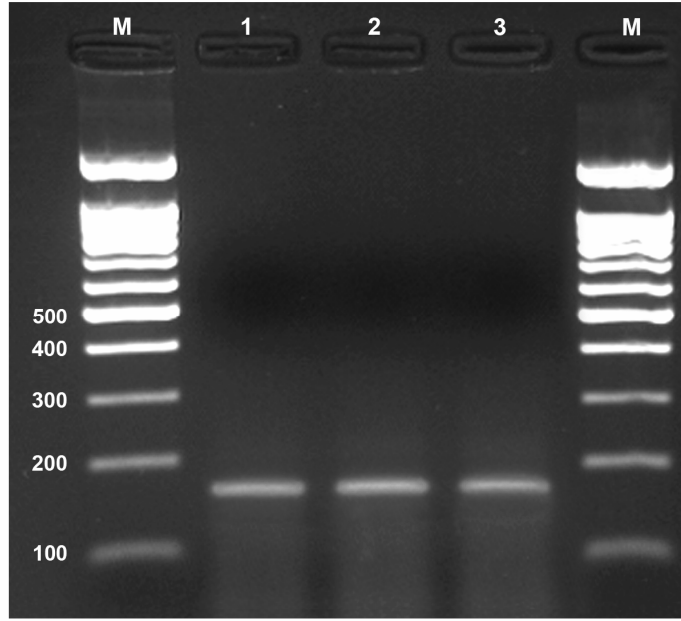
GP5/GP6 spesifik PCR ile HPV-pozitif olarak tespit edilen örneklere HPV-11, 16, 18 ve 33 tiplerine ait primerler ile HPV tiplemesi yapıldı. Tümör dokusu örneklerinde tespit edilen 41 HPV (+) örneğin 16'sında, çalıştığımız HPV tipleri bulundu. Buna göre örneklerin 8'inde HPV-16, 3'ünde HPV-18 ve 5'inde HPV-33 tespit edildi. Bu örneklerden ikisinde iki tip HPV tespit edildi. Bunlar bir örnekte hem HPV-16 hem HPV-33'dür, diğer örnekte ise hem HPV-18 hem HPV-33 şeklindedir (Şekil 7, 8, 9). Komşu normal dokudaki 33 HPV (+) örneğin ise sadece 5'inde, çalıştığımız HPV tiplerinden bulundu. Bunlar 3 örnekte HPV-18 ve 2 örnekte HPV-33 şeklindedir. Tümör ve komşu normal doku örneklerinin hiç birinde HPV-11 tespit edilmedi.



Şekil 7: HPV-16 için spesifik PCR'a yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1, 2 ve 3. sütunlar: 225 bç bant elde edilen HPV-16 (+) örnekler. M: 100 bç DNA boyut markırı.



Şekil 8: HPV-18 için spesifik PCR'a yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1, 2 ve 3. sütunlar: 143 bç bant elde edilen HPV-18 (+) örnekler. M: 100 bç DNA boyut markırı.



Şekil 9: HPV-33 için spesifik PCR'a yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1, 2 ve 3. sütunlar: 171 bç bant elde edilen HPV-33 (+) örnekler. M: 100 bç DNA boyut markırı.

Tümör dokusunda lokalizasyona göre HPV pozitifliğinin dağılımı ve yüzdesine bakıldığında 38 mide örneğinin 17'sinde (%44.7), 37 kolon örneğinin 13'ünde (%35.1), 19 rektum örneğinin 9'unda (%47.3), 4 özofagus örneğinin 1'inde (%25) ve 2 ince barsak örneğinin 1'inde (%50) HPV tespit edilmiştir (Tablo 9).

Tablo 9: Tümör dokusunda lokalizasyona göre HPV pozitifliğinin dağılımı (%)

| | HPV (+) (%) | HPV (-) (%) |
|-----------------------|------------------|------------------|
| Lokalizasyon | | |
| Mide | 17 (17.0) | 21 (21.0) |
| Kolon | 13 (13.0) | 24 (24.0) |
| Rektum | 9 (9.0) | 10 (10.0) |
| Özofagus | 1 (1.0) | 3 (3.0) |
| İnce Barsak | 1 (1.0) | 1 (1.0) |
| Toplam (n=100) | 41 (41.0) | 59 (59.0) |

5.8. Hasta grubunda HPV pozitifliği ve p53 kodon 72 polimorfizmi

Tablo 10'da hasta grubunda tümör dokusundaki HPV(+) ve HPV (-) örneklerde bireye ait p53 genotipinin dağılımı ve yüzdesi verilmiştir. Buna göre 100 tümör dokusunda 41 HPV (+) örneğin 36'sında (%36.0) Arg/Pro ve 5'inde (%5) Arg/Arg tespit edildi. Hem HPV (+) hem HPV (-) örneklerde Arg/Pro genotipinin frekansı Arg/Arg genotipinin frekansına oranla istatistiki olarak önemli düzeyde yüksek bulundu ($p<0.01$). Ancak Arg/Pro genotipinin HPV (+) ve (-) örneklerdeki dağılımında ve Arg/Arg genotipinin HPV (+) ve (-) örneklerdeki dağılımında önemli bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 10: Hasta grubunda tümör dokusunda HPV(+) ve (-) örneklerde, bireyin p53 genotipinin dağılımı (%)

| | Arg/Pro (%) | Arg/Arg (%) | p |
|----------------|-------------|-------------|----|
| HPV (+) (n=41) | 36 (36.0) | 5 (5.0) | ** |
| HPV (-) (n=59) | 52 (52.0) | 7 (7.0) | ** |
| p | — | | |

— : $p>0.05$

** : $p<0.01$

6. TARTIŞMA

6.1. Hasta ve Kontrol Grubunda p53 Kodon 72 Polimorfizminin Değerlendirilmesi

Bazı p53 polimorfizmlerinin çeşitli insan kanserlerine yatkınlıkla ve prognozla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. p53'ün yaygın bir polimorfizmi, kodon 72'de gerçekleşmektedir. Bu polimorfizm ya bir prolin (CCC) ya da bir arginin rezidüsü (CGC) içeren varyant bir proteinle sonuçlanmaktadır. p53 varyantlarının, transkripsiyonu aktive etmek, apoptozu indüklemek ve primer hücrelerin transkripsiyonunu baskılamak için transkripsiyonel sistemin komponentlerine bağlanma yeteneklerinde farklılıklar söz konusudur (81). p53 arjinin varyantı, apoptozisi indükleme ve transformasyonu baskılamada p53 prolin varyantından daha etkilidir (64). Pro/Pro genotipli hastalar diğer genotiplere sahip olanlara göre (özellikle sigara içen hastalar) akciğer kanseri gelişimine daha yatkındır. Meme kanseri olan hastalarda artmış prolin alleli frekansı (Pro/Pro veya Arg/Pro genotipleri) bulunmuştur (81). p53 kodon 72 polimorfizminin Arg ve Pro allelleri farklı mekanizmalar yoluyla farklı kanserlerde yükselmiş risklere neden olabilir (69). Çeşitli çalışmalar kodon 72 polimorfizminin mide adenokarsinom gelişiminde rol oynadığını öne sürmektedir (81). Ancak mide kanseri ve p53 polimorfizmiyle ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (82). p53'ün 2 polimorfik formu arasındaki farklılıkları ortaya koyan deneysel çalışmalara göre kodon 72'deki genotip kolorektal tümör gelişimine yatkınlığı değiştirebilir (38).

Çalışmamızda gastrointestinal sistem kanserli 106 hasta ve 107 sağlıklı bireyde p53 kodon 72 polimorfizmi araştırıldı. Hastalardaki p53 genotipi, tümöre komşu normal dokulara ait parafin blok kesitlerinden elde edilen DNA'larda çalışılırken, kontrol grubu olarak sağlıklı bireylerin periferik kanlarından elde edilen DNA'larda çalışıldı. Genotip frekansları, hastalar arasında %88.7 (94/106) Arg/Pro, %11.3 (12/106) Arg/Arg şeklindedir. Hasta grubunda Pro/Pro genotipi tespit edilmedi. Kontroller arasında ise %46.7 (50/107) Arg/Pro, %45.8 (49/107) Arg/Arg ve %7.5 (8/107) Pro/Pro'dir. Arg/Pro, Arg/Arg ve Pro/Pro genotiplerinin dağılımında istatistiki olarak önemli bir fark tespit edildi ($p < 0.01$). Hastalarda Arg/Pro genotipinin (94/106) kontrol grubuna (50/107) göre önemli derecede yüksek olduğu gözlemlendi. Hastalarda Arg/Arg genotipi (12/106) ise kontrol grubuna göre (49/107) önemli derecede düşüktü. Hastalarda Pro/Pro genotipi hiç gözlenmezken kontrol grubunda %7.5 (8/107) olarak tespit edildi. Hasta grubunda Pro/Pro genotipinin hiç gözlenmemesi, parafine gömülü doku kesitlerinden elde edilen DNA'nın iyi kalitede olmamasından kaynaklanabilir. Ancak bu çalışmada hasta grubunda p53 kodon 72 polimorfizmi için allel spesifik PCR her hasta için ikişer defa çalışılarak kontrol edildi. Bazı hastalarda bantların zayıf olması halinde 3. kez çalışıldı. Ya da hasta sayısının az olması ve her tümör tipine ait çalışma gruplarının küçük olmasından dolayı bu çalışmaya özgü olarak Pro/Pro genotipi görülmemiş olabilir. Bu sonuçlara göre Arg/Arg ve Pro/Pro genotipleri ile karşılaştırıldığında heterozigot Arg/Pro genotipinin önemli derecede artmış gastrointestinal sistem kanser riskiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Hasta ve kontrol grubunda Arg ve Pro allel frekanslarına bakıldığında Arg allel frekansı hastalarda 0.556, kontrollerde 0.691 ve Pro allel frekansı hastalarda 0.691, kontrollerde 0.308'dir. Hasta ve kontrol grupları arasında Arg ve Pro allel frekansları açısından istatistiki olarak önemli bir fark olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Hasta grubunda Pro allel frekansı kontrol grubuna göre yüksek olarak bulundu.

Benzer sonuçları Shen ve ark. da bir Çin popülasyonunda yaptıkları çalışmada bulmuşlardır. Bu çalışmada araştırmacılar mide kanserli 324 hasta ve 317 kontrol vakasını içeren çalışmada, periferik kandan elde edilen DNA'larda p53 kodon 72 polimorfizmini çalışmışlardır. Genotip frekansları hastalar arasında %29.6 Arg/Arg, %55.6 Arg/Pro ve %14.8 Pro/Pro şeklindedir. Kontroller arasında ise %29.6 Arg/Arg, %50.5 Arg/Pro ve %19.9 Pro/Pro'dir. Vaka ve kontroller arasında allel frekanslarında önemli bir fark bulmamışlardır. Ancak Pro/Pro genotipi ile karşılaştırıldığında heterozigot Arg/Pro genotipinin önemli derecede artmış mide kanseri riskiyle ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca risk genotipi olarak Arg/Pro ve Arg/Arg kombine genotipinin (Arg/Pro+Arg/Arg) önemli derecede artmış mide kanseri riskiyle (özellikle non-kardia gastrik kanser) ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (63).

Shephard ve ark. 217 gastrik kanserli hastadan elde edilen tümör ve normal dokuya ait parafine gömülü dokularda ekzon 4'deki değişimleri incelemişlerdir. Bu çalışmada 7 vakada ekzon 4 mutasyonu bulunmuştur. Ayrıca hasta grubunda kodon 72'de polimorfizm tespit etmişlerdir. Genotiplerin dağılımı %54 Arg/Arg, %33 Arg/Pro ve %13 Pro/Pro şeklindedir. Kodon 72 genotiplerinde istatistiki olarak önemli bir fark bulunmuştur (64).

Zhang ve ark. 102 mide kanserli hastada yaptıkları çalışmada kodon 72 polimorfizmi ve adenokarsinomlu hastaların prognozu arasında açık bir ilişki bulmamışlardır. Ancak yaş ile p53 Arg'nin artmış bir sıklığını tespit etmişlerdir ve homozigot Arg allelinin önemli derecede artmış mide kardia kanseriyle ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada Arg/Arg %53, Arg/Pro %43 ve Pro/Pro genotipi %4 frekansında belirlenmiştir. Genotiplerin erkek ve kadınlardaki dağılımı benzerdir. Ancak arjininin homozigot allelinin varlığı yaş ile pozitif ilişkili bulunmuştur (81).

Zhang ve ark. 2003 yılında yaptıkları başka bir çalışmada 120 mide kanseri vakası ve 277 kontrol örneğinde parafin bloktan elde ettikleri DNA ile p53 kodon 72 polimorfizmini araştırmışlardır. Bu çalışmada vaka ve kontrol grubu arasında kodon 72 genotip dağılımında bir fark olmadığı ancak kardia mide kanser hastalarında Arg/Arg genotipinin kontrol grubundan ve kardia olmayan mide kanser hastalarından daha yüksek bir yüzdeye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca 36 kanser vakasının gastrik tümör dokusunun genotipi aynı hastanın iyi ayrılmış normal dokusuyla da karşılaştırılmıştır. 36 tümör dokusu ve aynı hastanın normal dokusunun aynı genotipe sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada hastaların yaşı ve cinsiyeti değerlendirildiğinde mide kanserli hasta grubunda yaş ile kodon 72 Arg allelinin artmış sıklıkta olduğu gözlenmiştir. 75 ve üzeri yaşlardaki kanser hastalarında Arg/Arg genotipinin artmış bir sıklıkta olduğu ve genç yaş grubundaki kanser hastalarından ve kontrollerden 2 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre Zhang ve ark. kodon 72 Arg p53 genotipinin geç başlangıçlı mide kanseriyle ve uzamış yaşamsallıkla ilişkili

olabileceğini öne sürmektedirler (82). Çalışmamızda 75 yaş ve üzeri olan toplam 10 hastadaki p53 genotipi Arg/Pro heterozigot şeklinde olup böyle bir ilişki tespit edilmemiştir.

Çalışmamızda cinsiyete göre hasta ve kontrol grubunda p53 genotiplerinin dağılımına bakıldığında hasta grubunda Arg/Pro ve Arg/Arg genotiplerinin kadın ve erkeklerdeki dağılımında önemli bir fark gözlenmedi ($p>0.05$). Aynı şekilde hem hasta hem kontrol grubunda Arg/Pro, Arg/Arg, Pro/Pro genotiplerinin dağılımında 60 yaş altında ve 60 yaş ve üstünde önemli bir farklılık olmadığı tespit edildi ($p>0.05$).

Çalışmamızda kanser vakalarının 38'i mide, 42'si kolon, 20'si rektum, 4'ü özofagus ve 2'si ince bağırsak tümörüdür. Tümörün lokalizasyonuna göre p53 kodon 72 polimorfizminin dağılımına bakıldığında tüm lokalizasyonlarda Arg/Pro heterozigot genotipinin yüksek oranda olduğu gözlenmektedir.

Koloraktal kanser ve p53 Arg72Pro polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştıran bazı çalışmalarda birbiriyle uyumsuz sonuçlar elde edilmiştir. Bunların bir kısmında Pro taşıyan genotiple artmış bir risk tespit edilirken bir kısmında Pro taşıyan genotiplerin etkisiz olduğu ya da istatistiki olarak önemsiz zıt bir ilişkiye sahip olduğu bulunmuştur (38). Koushik ve ark. 442 kolorektal kanser ve 904 kontrol vakası ve ayrıca 856 kolorektal adenom ve 1184 kontrol vakasını içeren iki ayrı çalışma popülasyonunda yaptıkları bir çalışmada p53 Arg72Pro polimorfizminin kolorektal kanser ile ilişkili olmadığını, bununla birlikte Pro taşıyan genotipler ile ilişkili artmış bir kolorektal adenom riski tespit etmişlerdir. Kolorektal kanseri bölge spesifik olarak değerlendirdiklerinde ise Pro taşıyan

genotiplerin kadınlarda proksimal kolon kanseriyle ve erkeklerde ise distal kolon kanseriyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre Koushik ve ark. Pro allelinden dolayı p53-teşvikli apoptozisin azalmış etkinliğinin, kolorektal neoplazilerin erken basamaklarında rol oynayabileceğini ve kolorektal bölge ve cinsiyet göz önüne alındığında invaziv hastalığa ilerlemede bir faktör olabileceğini ileri sürmektedirler (38).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada Sul ve ark. 155 gastrik kanserli vaka ve 134 kontrol grubunda yaptıkları çalışmada p53 Pro/Pro polimorfizmi ile gastrik kanser arasında önemli bir ilişki olmadığını tespit etmişlerdir (70).

Hiyama ve ark. bir Japon popülasyonunda 117 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)-kronik gastritli gastrik kanserli ve 116 *H.pylori*-ilişkili kronik gastritli kontrol vakasında yaptıkları bir çalışmada, gastrik kanserli hastalar ve kontrol vakaları arasında p53 kodon 72 polimorfizmi açısından önemli bir fark olmadığını bulmuşlardır. Bu çalışmada kontrol vakalarında %43.1 Arg/Arg genotipi, %44.8 Arg/Pro ve %12.1 sıklıkta Pro/Pro genotipi bulunurken gastrik kanser hasta grubunda da benzer olarak % 41.9 Arg/Arg, %44.4 Arg/Pro ve % 13.7 sıklıkta Pro/Pro genotiplerini bulmuşlardır. Ancak difüz-tip gastrik kanserli hastalar ile kontrolleri karşılaştırdıklarında Pro/Pro genotipinin difüz-tip gastrik kanser yatkınlığına katkıda bulunabileceğini ileri sürmektedirler (27).

Çalışmamızda p53 kodon 72 polimorfizmi değerlendirilirken, bir bireyin tüm hücrelerindeki genotipi yansıtması bakımından hastaların tümöre komşu olan normal dokusundaki genotip esas alındı. Ancak tümör dokusu da ayrıca p53 kodon 72 polimorfizmi açısından değerlendirildi. Çalışılan 106 tümör dokusu

örneğin 80'indeki p53 genotipi komşu normal dokuyla aynı olarak bulundu. Kalan 26 örnekte ise normal dokudan farklı genotipler tespit edildi. Bunlar; 18 örnekte komşu normal dokudaki p53 genotipi Arg/Pro iken tümör dokusunda Arg/Arg şeklinde ve 8 örnekte ise normal dokudaki genotip Arg/Arg iken tümör dokusunda Arg/Pro şeklindedir. Burada tümör dokusunda farklı genotiplerin elde edilmesinin, p53 geninin bir TS gen olması sebebiyle heterozigosite kaybına (LOH, loss of heterozygosity) uğrayabilmesinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. İlk 18 örnekte Pro allelinin mutasyonu sonucu LOH gerçekleşmiş olabilir, sonraki 8 örnekte ise Arg allelinde bir mutasyon meydana gelmiş olabilir.

Kodon 72 polimorfizmi için heterozigot (R72/P72) olan bireylerden elde edilen tümörlerde R72 alleli mutasyona daha çok maruz kalırken P72 alleli çoğunlukla delesyonla kaybedilmektedir (57).

Benzer bir çalışma Langerod ve ark. tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada farklı p53 mutasyon spektrumuna sahip meme ve kolorektal karsinomlu hastalarda kodon 72 polimorfizmi araştırılmıştır. Bu çalışmada p53 mutasyonları 162 kolorektal kanser vakasınının hem kan hücrelerinden hem tümör dokusundan çalışılmıştır. Kodon 72 polimorfizmi periferik kandan elde edilen DNA'da, p53 mutasyon tespiti ise tümör DNA'sında uygulanmıştır. 162 kolorektal kanserdeki allel frekansları Arg 72 için 0.75 ve Pro72 için 0.25'dir. p53 genindeki mutasyon frekansı ise %48.1'dir. Mutasyon frekansı ve iki farklı homozigot arasında farklılık bulunmamıştır. Doksanyedi Arg homozigot vakada 40 p53 mutasyonu, 16 Pro homozigot vakada ise 7 p53 mutasyonu tespit edilmiştir. Sadece resesif

mutasyonların tercihi olarak Arg72 allelinde lokalize olduğu ileri sürülmektedir (40).

Çeşitli gruplar p53 R72 varyantı (p73'e daha iyi bağlanıp inaktive etmektedir) ile gastrik kanser, meme kanseri, ovaryan, özofagus, deri, akciğer, mesane, prostat ve larinks içeren epiteliyal kanserler arasında artmış bir risk olduğunu rapor etmişlerdir. Bununla birlikte diğer çalışmalarda araştırmacılar bunun tersi bir ilişki bulmuşlardır. Yani P72 varyantı ile tiroid, nazofarinks, prostat, deri, ürogenital bölge ve akciğer kanserlerini içeren çeşitli kanser tipleri arasında artmış bir risk bulmuşlardır. Diğer bazı gruplar ise kanser riski ve p53 kodon 72 varyantları arasında herhangi bir ilişki tespit etmemişlerdir. Bu farklılıklar mutasyonel durumu belirlemedeki hatadan kaynaklanabilir (57).

Arg/Arg ve Pro/Pro genotiplerinin rolü hakkında birkaç açıklama bulunmaktadır. Birincisi, transkripsiyonal özelliklerinin farklı olmasıdır. Arg/Arg ve Pro/Pro varyantlarının transkripsiyonu aktive etmek için bağlanma aktivitesinde ve apoptozisi indüklemeye ya da hücre siklusunu durdurmada farklı oldukları gösterilmiştir. p53 Arg/Arg varyantı apoptozisi Pro/Pro varyantından daha hızlı bir kinetikle indüklemektedir. Yani eğer mide kanserinde yüksek oranda Arg/Arg genotipi varsa bu apoptozisi ve hücre siklusunu durdurmayı etkili olarak indükler. Bunun sonucunda da daha iyi bir prognoz olabilir. İkincisi wild-tip p53 proteini hızlı degrade olmaktadır, kısa yarı ömre sahiptir ve düşük hücre içi seviyesine sahiptir. Kodon 72'de Arg'nin Pro ile substitüsyonuyla sonuçlanan p53 proteininin yapısal farklılığı, çeşitli karsinojenler tarafından oluşturulan uyaranlara cevapta farklı fonksiyonlara sahip olabilir (79).

Sonuç olarak p53 varyantları major insan neoplazmları için risk faktörleri olabilirler ve kanser için çevresel risk faktörlerinin modülasyonunda önemli bir rol oynayabilirler (64).

6.2. Hasta ve Kontrol Grubunda Tespit Edilen HPV'nin Değerlendirilmesi

Son zamanlardaki çalışmalar bazı virüs tiplerinin, özellikle HPV'nin, kolorektal kanser patogeneziyle ilişkili olabileceğini desteklemektedir. HPV'nin karsinogenik etkisi konakçı hücre DNA'sına viral entegrasyon ve viral onkoproteinlerin ekspresyonundan kaynaklanmaktadır (19).

HPV'nin hücre proteinleri ile etkileşen transforme edici proteinleri hücre proliferasyonunun kontrolünde etkilidir (17). Yüksek-riskli HPV'ler ile enfeksiyon sonucunda normal hücrelerin DNA hasarına cevabı bozulabilmektedir (35). HPV'nin onkogenik potansiyelinin özellikle 2 erken viral gen ürünü olan E6 ve E7 ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Bu proteinler, TS genler tarafından kodlanan proteinlerle etkileşirler (39). Çalışmalar, birkaç DNA tümör virüsünün transforme edici proteinlerinin özellikle p53 proteini ile etkileştiğini göstermektedir (41).

İnsan kanserlerinde HPV ile ilgili verilere göre HPV DNA tüm kanserlerin yaklaşık %10'unda bulunmaktadır (26). PCR ve *in situ* hibridizasyon teknikleri ile kolorektal kanser dokularında HPV DNA tespiti, HPV enfeksiyonunun kolorektal kanser gelişimiyle de ilişkili olabileceğini desteklemektedir (12). HPV tipleri

arasında “yüksek riskli” olarak adlandırılan HPV tipleri (özellikle HPV-16 ve HPV-18) insan kanserlerinin gelişiminde güçlü bir şekilde etkilidir (28).

Çalışmamızda 100 tümör dokusu örneğinin 41’i (%41) HPV (+), 59’u (%59) HPV (-) ve 106 tümöre komşu normal dokunun 33’ü (%31.1) HPV (+), 73’ü (%68.8) HPV (-) olarak tespit edildi. Tümör dokusu örneklerinde tespit edilen 41 HPV (+) örneğinin 16’sında, çalıştığımız 4 tip HPV’den biri bulundu. Buna göre örneklerin 8’inde HPV-16, 3’ünde HPV-18 ve 5’inde HPV-33 tespit edildi. Bu örneklerden ikisinde iki tip HPV tespit edildi. Bunlar bir örnekte hem HPV-16 hem HPV-33’dür, diğer örnekte ise hem HPV-18 hem HPV-33 şeklindedir. Komşu normal dokudaki 33 HPV (+) örneğinin ise sadece 5’inde, çalıştığımız HPV tiplerinden bulundu. Bunlar 3 örnekte HPV-18 ve 2 örnekte HPV-33 şeklindedir. Tümör ve komşu normal doku örneklerinin hiç birinde HPV-11 tespit edilmedi. Tümör dokusunda 41 HPV (+) örneğinin sadece 16’sında ve normal dokuda 33 HPV (+) örneğinin 5’inde, çalıştığımız 4 tip HPV tespit edildi. Bu durum bantların zayıflığından kaynaklanabilir. Ya da kalan diğer HPV (+) örneklerde, 4 tipin dışında kalan yaklaşık 100’e yakın diğer yüksek ve düşük riskli HPV tipleri mevcut olabilir. Tümör dokusunda lokalizasyona göre HPV pozitifliğinin dağılımı ve yüzdesine bakıldığında 38 mide örneğinin 17’sinde (%44.7), 37 kolon örneğinin 13’ünde (%35.1), 19 rektum örneğinin 9’unda (%47.3), 4 özofagus örneğinin 1’inde (%25) ve 2 ince barsak örneğinin 1’inde (%50) HPV tespit edildi.

Perez ve ark. 54 sporadik kolorektal adenokarsinom örneğinde ve vakalardan elde edilen 30 normal biyopsi örneğinde PCR ile HPV tespiti

yapmışlardır. DNA parafine gömülü dokulardan elde edilmiştir. HPV DNA vakaların %74'ünde (40/54) ve normal dokuların %33'ünde (10/30) tespit edilmiştir. Vaka grubunda tespit edilen HPV tipleri HPV-16 (22/40), HPV-18 (13/40), HPV-33 (4/40) ve HPV-6 (3/40) şeklindedir. Pozitif örneklerin 3'ünde PCR ürünüdeki zayıf sinyalden dolayı virüs tipi belirlenememiştir. Kontrol grubunda ise sadece HPV-16 bulunmuştur. İlginç olarak düşük riskli HPV-6 ve HPV-11 kontrol grubunda tespit edilmemiştir. HPV DNA sıklığı vakalarda kontrollerden daha yüksek olup istatistiki olarak önemli bir ilişkiyi göstermektedir. Çalışmanın sonuçlarına göre Perez ve ark. HPV enfeksiyonunun kolorektal adenokarsinomda rol oynayabileceğini ileri sürmektedirler (56).

De Villiers ve ark. bir Çin popülasyonunda 117 özofageal karsinom örneğinden sadece üçünde yüksek risk HPV tipleri olan HPV-16, 18 ve 33'ü tespit etmişlerdir (53).

Lee ve ark. 19 kolorektal kanserli hastanın tümör dokusu ve komşu normal dokusunda yaptıkları çalışmada tümör dokularının %84'ünde (16/19) ve normal mukozanın %53'ünde (10/19) HPV-18 tespit etmişlerdir. Buna göre Lee ve ark. HPV-18 enfeksiyonunun kolorektal kanserle ilişkili olabileceğini ileri sürmektedirler (42).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada 55 kolorektal kanserli vakanın tümör dokusu ve normal dokusu, ayrıca 10 kanser olmayan bireyin normal dokusu HPV açısından incelenmiş ve vakaların %51'inde (28/55) HPV DNA tespit edilmiştir. HPV DNA komşu normal dokuların %29'unda (15/52) bulunurken 10 sağlıklı bireye ait normal dokuların hiç birinde tespit edilmemiştir. Hem tümör

hem komşu dokuda tespit edilen toplam 38 HPV pozitif dokunun 31'i HPV-16, 5'i HPV-18 ve 2'si HPV-43'tür. Bu çalışmada araştırmacılar başlangıçta HPV tespitinde tümöre komşu olan dokularda bir kontaminasyon olabileceğini düşünmüşler ve bunu test etmek için 10 yeni vakada kontaminasyonu önleyecek önlemler alınarak bu dokularla çalışılmıştır. Bu yeni grupta HPV DNA tümör dokusunun 3'ünde (3/10) ve komşu dokunun 1'inde (1/10) bulunmuştur. Böylece gerçekte bir kontaminasyon olmadığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre araştırmacılar kolorektal HPV-16 enfeksiyonunun kolorektal kanser dokusu ve komşu normal dokuda yaygın olarak görüldüğünü ve HPV'nin kolorektal kanserin patogeneğinde bir rol oynayabileceğini ileri sürmektedirler (12).

Buyru ve ark. bir Türk popülasyonunda 53 kolon kanserli hastanın tümör örneği ve komşu normal dokulardan elde edilen DNA'da HPV tip 6, 11, 16, 18 ve 33'ün varlığını araştırmışlardır. HPV DNA, tümörlü dokuların 43'ünde (%81.2), komşu normal dokuların ise 12'sinde (%32) bulunmuştur. En fazla HPV-18 ve 33 tipleri belirlenmiştir. Komşu normal doku örneklerinde HPV-18 bulunmamıştır. Normal dokuda en fazla HPV-16 (%15) ve HPV-11 (%13.2) belirlenmiştir. Bu çalışmada HPV-18 ve 33 hariç normal ve tümör dokuları arasında HPV tiplerinin dağılımında önemli bir fark tespit edilmemiştir. Buyru ve ark. yüksek-risk HPV DNA'nın malign lezyonlarda yüksek sıklıkta bulunduğunu ve HPV enfeksiyonunun kolorektal karsinomda rol oynayabileceğini ileri sürmektedirler (15).

Son zamanlarda spesifik HPV tiplerinin normal ve malign kolon dokularındaki varlığını araştırmak için yapılan bir çalışmada nested PCR ile 30 normal kolon dokusu ve 54 sporadik adenokarsinom rneği parafine gömülü dokulardan elde edilen DNA ile çalışılmıştır. HPV DNA vakaların %74'ünde (40/54) ve normal dokuların %33'ünde (10/30) tespit edilmiştir. Vaka grubunda en fazla HPV-16, sonra sırasıyla HPV-18, 33 ve 6 tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise sadece HPV-16 belirlenmiştir. İlginç olarak kontrol grubunda düşük-risk HPV tipleri olan HPV-6 ve 11 belirlenmemiştir. Ayrıca HPV-pozitif vakaların %12.5'inde (5/40) ikili enfeksiyon grlmştir. Bu çalışmada vakalardaki HPV DNA prevalansı yüksektir ve istatistiki olarak önemli bir ilişkiyi ortaya koymaktadır (56).

Damin ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 72 kolorektal kanserli hastaya ait tümör dokusunun 60'ında (%83.3) HPV DNA tespit edilmiştir. Kanser olmayan 30 kontrole ait normal dokuların hiç birinde HPV DNA bulunmamıştır. Tümör dokusuna komşu olan 15 cm proksimaldeki normal doku örneklerinde ise %50 (36/72) oranında HPV DNA tespit edilmiştir. Yirmi kanser vakası (%31.9) hem tümör hem komşu normal dokuda HPV DNA içerirken 23' (%31.9) sadece tümör dokusunda ve 14' (%19.4) sadece komşu normal dokuda HPV içermektedir. En fazla HPV-16, daha sonra HPV-6 ve 11 bulunmuştur. HPV-33 ve 45 tespit edilmemiştir. Bu çalışmada farklı olarak kolorektal örneklerde ilk defa oto-nested GP5+/GP6+ PCR uygulanmıştır. Bu tekniğin uygulandığı farklı bir çalışmada oral mukoza örneklerinde önce GP5+/GP6+ primerleri kullanılarak %35.8 oranında HPV tespit edilirken GP5+/GP6+ oto-nested PCR uygulandığında

pozitiflik oranı %65.1'e yükselmiştir. Damin ve ark. GP5+/GP6+ oto-nested PCR ile kolorektal kanserli hastalarda %83.3 oranında yüksek bir HPV prevalansı tespit etmişlerdir (19).

Normal kolon mukozasında ve kolon neoplazmlarında HPV'nin gerçek prevalansı henüz bilinmemektedir. Kolon dokusunda HPV DNA'nın varlığı çelişkili kalmıştır. Shraye ve ark. ve Shah ve ark. PCR metodu kullanarak kolon biyopsilerinde HPV DNA tespit etmemişlerdir. Bu farklılıklar örnek sayısından, örnek toplanmasından, coğrafik farklılıklardan veya kullanılan metodların farklı hassaslıklarından kaynaklanabilir. HPV'nin kolorektal karsinogenezdeki rolüyle ilgili daha tanımlayıcı bir data elde edebilmek için HPV ve kolorektal kanserler arasındaki potansiyel ilişki diğer çalışmalarla desteklenmelidir (56).

Çalışmamızda 100 tümör örneğinin 41'inde, komşu normal dokunun ise 33'ünde HPV DNA tespit edilmiş olup, tümör ve normal doku arasında HPV DNA frekansı açısından istatistiki olarak önemli bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Ancak bu çalışmada kullanılan komşu normal doku tümör dokusundan yeterince iyi ayrılmamış olabilir ve HPV DNA kontaminasyonu gerçekleşmiş olabilir. Buna rağmen HPV DNA gastrointestinal sistem kanserleri vakaların %41'inde (41/100) ve komşu normal dokunun %31.1'inde (33/106) olmak üzere yüksek bir oranda tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre HPV enfeksiyonunun gastrointestinal sistem dokusu ve komşu normal dokuda yaygın olarak görüldüğünü ve HPV'nin gastrointestinal sistem kanserin patogeneğinde bir rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.

HPV çeşitli kanserlerde etiyolojik bir faktör olarak rol oynadığı için HPV aşılarının geliştirilmesi önem kazanmıştır. Özellikle servikal kanser ve diğer HPV-ilişkili malignansilerin tedavisinde ve önlenmesinde bu aşılar etkili olabilmektedir. Profilaktik HPV aşıları, L1 ve L2 HPV kapsid proteinlerine karşı nötralize edici antikörleri indükleyerek enfeksiyonu önlerler. Fakat HPV-enfekte bazal keratinositler ve HPV-transforme hücreler genellikle E1 veya E2'yi ekspresse etmedikleri için terapötik HPV aşıları E6 ve E7 gibi HPV'nin yapısal olmayan erken viral antijenlerini hedeflemeyi amaçlamaktadır. Preklinik HPV aşı çalışmaları ile birkaç HPV aşısı geliştirilmiştir. Eğer bu profilaktik ve terapötik HPV aşıları hayvan modellerinde olduğu kadar hastalarda da başarılı olursa aşılama, onkojenik HPV enfeksiyonunu ve HPV-ilişkili kanserlerin kontrolü ve ortadan kaldırılmasını sağlayabilir (44).

HPV E6 ve E7 malign transformasyondan sorumlu olduğundan ve HPV-ilişkili malignansilerde birlikte ekspresse olduklarından E6 ve E7'yi hedefleyen aşılarda kombinasyonunun sadece E6 ya da E7'yi hedefleyen aşılarından potansiyel olarak daha iyi bir antitümör etkisine sahip olduğu gösterilmiştir (54).

6.3. HPV pozitifliği ve p53 Kodon 72 Polimorfizminin Değerlendirilmesi

p53 TS geninin kodon 72 polimorfizminin, HPV-ilişkili kanserlerin gelişiminde bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmektedir (67). Son zamanlarda HPV içeren viral karsinogenezde, konakçının genetik alt yapısının bir kofaktör olarak etki ettiği moleküler bir temel tanımlanmıştır. Buna göre insan p53 geninin

kodon 72 Arg formu, HPV E6 tarafından degradasyona Pro formundan daha hassastır (14).

HPV E6 ekspresyonu p53 protein seviyesinde ciddi bir azalmayla ilişkilidir. E6 ekspresye eden HPV-enfekte hücreler, mutant p53'e sahip hücrelerdekine benzer olarak genetik değişikliklerin birikimine daha yatkın olabilirler (35).

Yüksek-risk HPV ekspresye eden hücrelerde p53 seviyesi enfekte olmayan normal hücrelerle karşılaştırıldığında düşüktür. p53 mRNA seviyesi etkilenmemektedir fakat p53 proteininin yarı ömrü azalmaktadır. Bu yüzden yüksek-risk HPV'ler p53 TS proteininin proteolitik degradasyonunu hızlandırarak onu inaktive etme stratejisi geliştirmişlerdir (52). p53'ün wild tip allel formu, HPV infeksiyonunu takiben E6 onko-proteini tarafından degradasyona Pro72 varyantından daha hassastır (21).

Çalışmamızda 100 tümör dokusunda 41 HPV (+) örneğin 36'sında (%36.0) Arg/Pro ve 5'inde Arg/Arg tespit edildi. HPV (-) olan 59 örneğin ise 52'sinde (%52.0) Arg/Pro, 7'sinde (%7.0) Arg/Arg genotipi tespit edildi. Hem HPV (+) hem HPV (-) örneklerde Arg/Pro genotipinin frekansı Arg/Arg genotipinin frekansına oranla yüksek bulundu. Ancak Arg/Pro genotipinin HPV (+) ve (-) örneklerdeki dağılımında ve Arg/Arg genotipinin HPV (+) ve (-) örneklerdeki dağılımında önemli bir fark saptanmadı.

Inserra ve ark. farklı etnisiteye sahip servikal kanserli hastalarda p53 kodon 72 polimorfizmi ve HPV direncini inceledikleri çalışmada p53 polimorfizminin herhangi bir HPV tipi ile ilişkisi olmadığını bulmuşlardır (30).

Gustafsson ve ark. HPV-ilişkili servikal kanserlerde p53 kodon 72 polimorfizmini inceledikleri bir çalışmada p53 kodon 72 genotipi ile adenokarsinom geliştirme riski arasında önemli ilişki olmadığını tespit etmişleridir. 142 servikal biyopsi ve komşu normal dokuyu içeren bu çalışmada HPV-ilişkili servikal kanser ve kodon 72 genotipinin dağılımı benzer olarak bulunmuştur (23).

Son zamanlarda bir Arjantin popülasyonunda yapılan çalışmada 53 sporadik kolorektal karsinom ve 109 sağlıklı bireye ait parafine gömülü dokulardan elde edilen DNA'lar ile p53 kodon 72 polimorfizmi ve HPV arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu çalışmada kontrol örneklerinde p53 genotip dağılımı Arg/Arg %40.3, Arg/Pro %48.6 ve Pro/Pro %11.1 vakalarda ise Arg/Arg %58.5, Arg/Pro %37.7 ve Pro/Pro %3.8 olarak bulunmuştur. Kontrollerdeki Arg allel frekansı 0.65, Pro allel frekansı 0.35 iken vakalardaki Arg allel frekansı 0.77 ve Pro 0.23'tür. Arg/Arg genotipi için vaka ve kontroller arasında önemli bir farklılık tespit edilmiştir. HPV DNA sadece vaka grubunda çalışılmıştır. Vakaların %41.5'inde (22/53) HPV-16, %24.5'inde (13/53) HPV-18 ve %7.5'inde HPV-33 bulunmuştur. HPV-negatif örneklerde p53 polimorfizm dağılımı %53.8 (7/13) Arg/Arg ve %46.1 (6/13) Arg/Pro şeklindedir. HPV-pozitif örneklerde ise %60 (24/40) Arg/Arg, %35 (14/40) Arg/Pro ve %5 (2/40) Pro/Pro şeklindedir. Arg alleli ve HPV enfeksiyonu açısından iki grup arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Bu çalışmada kolorektal kanser lezyonlarındaki Arg allel frekansı normal örneklerle karşılaştırıldığında 2 kat artış göstermektedir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar p53 kodon 72 polimorfizminin kolorektal kansere

yatkınlık oluşturabileceğini fakat bunun yüksek-risk HPV ile ilişkili olmadığını ne sürmektedirler (55).

Homozigot Arg alleli HPV-ilişkili servikal kanserlerin %77'sinde tespit edilmiştir. Bu oran normal populasyonunda %37 olarak bulunmuştur. E6 tarafından p53 Arg'nin daha hızlı degradasyonu, artmış hücresel mutasyon oranıyla ve genomik instabiliteyle sonuçlanacaktır. p53 Pro ise degradasyona daha dirençli olup bu sayede sonraki genetik hasarlardan hücreyi koruyacaktır. Eğer tüm risk faktörleri eşitse p53 Arg alleli, malign değişim için 7 kat artmış yüksek risk oluşturmaktadır (17).

Kawaguchi ve ark. HPV-16/18 pozitif olan örneklerde Arg taşıyan p53 protein formunun E6 proteini tarafından degradasyona HPV-16/18 negatif örneklerden daha yatkın olduğunu bulmuşlardır (34). Çalışmamızda HPV-16/18 için pozitif olan toplam 11 örnekteki p53 genotipi Arg/Pro heterozigot olup bu durum p53 proteininin HPV E6 proteinini tarafından degradasyona daha yatkın yapabilir.

Çalışmamızda tümör dokusu örneklerinde 41 HPV (+) rneğin 36'sında (%36.0) Arg/Pro ve 5'inde (%5.0) Arg/Arg tespit edilmiş olup p53 genotipinin HPV (+) ve (-) rneklerdeki dağılımda önemli bir fark saptanmadı. Bu yüzden p53 kodon 72 polimorfizminin gastrointestinal sistem kanserlerine yatkınlık oluşturabileceğini, ayrıca HPV'nin gastrointestinal sistem kanser patogenezinde bir rol oynayabileceğini fakat p53 polimorfizminin herhangi bir HPV tipi ile ilişkisi olmadığını düşünmekteyiz.

6.4. Öneriler

Kolorektal kanser en yaygın üçüncü kanser olup dünya sağlık örgütünün tahminlerine (WHO) göre her yıl 945 000 yeni vaka görülmekte ve bunların 492 000'i ölümlerle sonuçlanmaktadır (76). Aynı şekilde mide kanseri de tüm dünyada en yaygın malignansilerden biridir (79). Kanserin oluşması ve ilerlemesinde hem genetik hem çevresel faktörler rol oynamaktadır. Genetik faktörler bir diğeriyle ve çevreyle etkileşerek riski arttırmakta ya da azaltmaktadır (6). Toplumda yaygın olan bu hastalık grubu için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi ve etyopatogenezinin tam olarak aydınlatılabilmesi açısından genetik polimorfizm çalışmaları oldukça büyük öneme sahiptir.

İnsan genomunda polimorfizmlerin büyük çoğunluğu fonksiyonel olarak nötraldir yani protein yapı ve fonksiyonunu etkilemez. Bununla birlikte bazıları gen transkripsiyonu, mRNA stabilitesi, RNA splicingi, protein yapısı ve fonksiyonunu etkileyen çeşitli yollarla genetik kodu değiştirebilmektedir. Böyle değişiklikler hastalık yatkınlığını ve ciddiyetini artırma ya da azaltma, tedaviye cevap ve yan etkilere hassaslık gibi farklı klinik etkiler oluşturabilir (6).

Kanserde SNP'lerin popülasyon asosiyasyon çalışmaları hastalık riski, ciddiyeti, tedaviye cevap ve yan etkileri önceden tahmin etmek ve uygun danışmanlık verilmek açısından oldukça önemlidir (6).

Kanser riski ve kodon 72 polimorfizmi arasındaki ilişki henüz açık olmasa da bu polimorfik varyantlar ile kanser gelişimi, kanser başlangıç yaşı ve tedaviye cevap arasındaki ilişki daha fazladır (57).

Kodon 72 genotipi farklı ırklarda önemli değişkenlik göstermektedir. Pro/Pro genotipi siyah ırkta %37, Asyalılarda %22 ve beyaz ırkta %7 frekansta olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden çeşitli çalışmalardaki allel frekanslarının farklılığı hasta populasyonunun hem coğrafik hem etnik farklılıklarını yansıtabilir (27, 64).

Bu p53 varyantının fonksiyonel önemi tam olarak anlaşılmasa da bu polimorfizmin kanser yatkınlığıyla ilişkili olup olmadığı araştırılmaya devam etmektedir (63).

Kanser gelişiminde rol oynayan genlerin belirlenmesi kanserin moleküler temelini anlaşılması için oldukça önemlidir. p53 TS proteini, hücre proliferasyonu, apoptozis ve genomik stabilitenin korunmasında temeldir. Genomik değişiklikler, çevresel ve bakteriyel ürünlerle interaksiyon sonucu oluşan p53 fonksiyon kaybının insan karsinogenezinde kritik bir basamak olduğu düşünülmektedir (79).

Son zamanlarda insan genomundaki doğal genetik varyasyonlar ve bunların klinik ve fonksiyonel önemleriyle ilgili bilgi patlaması yaşanmaktadır. Bu bilimsel ilerleme bize yaygın multifaktöriyel hastalıkların oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynayan genetik faktörlerin kompleks rolünü anlamamıza yardımcı olacaktır (6).

Son yıllarda ayrıca onkogeneze katkısı olan tümör virüslerinin moleküler mekanizmasının anlaşılmasında da önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. İnsan kanserlerinde tümör virüslerinin rolü epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarla desteklenmelidir.

İnsan kanserlerinde viral etkenlerin moleküler mekanizmasını karakterize etmek için çalışmalar devam edecektir (14). Ayrıca papillomavirüslerin spesifik tiplerinin belirlenmesi tedavide yeni stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

Bu çalışmanın sonuçları ışığında p53 kodon 72 polimorfizminin gastrointestinal sistem kanserlerine yatkınlık oluşturabileceğini, ayrıca HPV'nin gastrointestinal sistem kanser patogeneğinde bir rol oynayabileceğini fakat p53 polimorfizminin herhangi bir HPV tipi ile ilişkisi olmadığı düşünülmektedir. Ancak tümöre komşu normal dokuda kontaminasyon riskinden dolayı, sağlıklı oldukları tespit edilen bireylerin dokularında HPV çalışılması, daha doğru bilgi verici olacaktır. Gerek kodon 72 polimorfizminin gastrointestinal sistem kanserlerine yatkınlık oluşturması gerekse HPV'nin gastrointestinal sistem kanser patogeneğinde bir rol oynayabileceği konusu, daha fazla çalışmayla desteklenmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Ahn WS, Bae SM, Chung JE, Lee HK, Kim BK, Lee JM, Namkoong SE, Kim CK, Sin JI. (2003). Evaluation of adenoassociated virus 2 and human papillomavirus 16 and 18 infection in cervical cancer biopsies. *Gynecol Oncol* 89(1):105-111.
2. Akin H. (2003). Tıbbi Genetik Terimleri Sözlüğü. *Sendrom III* 1(1):17.
3. Alani RM, Munger K. (1998). Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol* 16(1):330-337.
4. Audeau A, Han HW, Johnston MJ, Whitehead MW, Frizelle FA. (2002). Does human papilloma virus have a role in squamous cell carcinoma of the colon and upper rectum? *Eur J Surg Oncol* 28(6):657-660.
5. Avvakumov N, Torchia J, Mymryk JS. (2003). Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. *Oncogene* 22(25):3833-3841.
6. Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. (2004). Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *Eur J Surg Oncol* 30(6):593-601.
7. Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT. (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* 63(3):1404-1407.
8. Benard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC. (2003). TP53 family members and human cancers. *Hum Mutat* 21(3):182-191.
9. Bernat A, Avvakumov N, Mymryk JS, Banks L. (2003). Interaction between the HPV E7 oncoprotein and the transcriptional coactivator p300. *Oncogene* 22(39):7871-7881.
10. Beutner KR, Tyring S. (1997). Human papillomavirus and human disease. *Am J Med* 102(5A):9-15.
11. Birgander R, Själander A, Rannug A, Alexandrie AK, Sundberg MI, Seidegård J, Tornling G, Beckman G, Beckman L. (1995). P53 polymorphisms and haplotypes in lung cancer. *Carcinogenesis* 16(9):2233-2236.
12. Bodaghi S, Yamanegi K, Xiao SY, Da Costa M, Palefsky JM, Zheng ZM. (2005). Colorectal papillomavirus infection in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 11(8):2862-2867.
13. Brookes AJ. (1999). The essence of SNPs. *Gene* 234(2):177-186.
14. Butel JS. (2000). Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* 21(3):405-426.

15. Buyru N, Tezol A, Dalay N. (2006). Coexistence of K-ras mutations and HPV infection in colon cancer. *BMC Cancer* 6:115.
16. Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, Di Liberto C, Scully C, Lo Muzio L. (2007). Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions. *Int J Oncol* 30(4):813-823.
17. Campo MS. (1998). HPV and cancer: the story unfolds. *Trends Microbiol* 6(11):424-426
18. Cooper GM, Hausman RE. (2006). *Hücre. Moleküler Yaklaşım. Üçüncü Baskı. Çeviri Editörleri: Meral Sakızlı, Neşe Atabey. İzmir Tıp Kitabevi, İzmir.*
19. Damin DC, Caetano MB, Rosito MA, Schwartsmann G, Damin AS, Frazzon AP, Ruppenthal RD, Alexandre CO. (2007). Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 33(5):569-574.
20. Fan R, Wu MT, Miller D, Wain JC, Kelsey KT, Wiencke JK, Christiani DC. (2000). The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9(10):1037-1042.
21. Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutierrez-Enriquez S, Hall J, Guino E, Peinado MA, Capella G, Canzian F. (2004). A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene* 23(10):1954-1956.
22. Gough SM, McDonald M, Chen XN, Korenberg JR, Neri A, Kahn T, Eccles MR, Morris CM. (2003). Refined physical map of the human PAX2/HOX11/NFKB2 cancer gene region at 10q24 and relocalization of the HPV6AII viral integration site to 14q13.3-q21.1. *BMC Genomics* 4(1):9.
23. Gustafsson AC, Guo Z, Hu X, Ahmadian A, Brodin B, Nilsson A, Pontén J, Pontén F, Lundeberg J. (2001). HPV-related cancer susceptibility and p53 codon 72 polymorphism. *Acta Derm Venereol* 81(2):125-129.
24. Hahn M, Koufaki ON, Schackert HK. (1998). Molecular biology of colorectal cancer and clinical consequences for colorectal cancer syndromes. *Langenbecks Arch Surg* 383(6):389-396.
25. zur Hausen H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92(9):690-698.
26. Hausen H, de Villiers EM. (1994). Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* 48:427-447.

27. Hiyama T, Tanaka S, Kitadai Y, Ito M, Sumii M, Yoshihara M, Shimamoto F, Haruma K, Chayama K. (2002). p53 Codon 72 polymorphism in gastric cancer susceptibility in patients with *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis. *Int J Cancer* 100(3):304-308.
28. Hoppe-Seyler F, Butz K. (1999). Human tumor viruses. *Anticancer Res* 19(6A):4747-4758.
29. Huang SM, McCance DJ. (2002). Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. *J Virol* 76(17):8710-8721.
30. Inserra P, Abrahamsen M, Papenfuss M, Giuliano AR. (2003). Ethnic variation of the P53 codon 72 polymorphism, HPV persistence, and cervical cancer risk. *Int J STD AIDS* 14(12):800-804.
31. Ishiji T. (2000). Molecular mechanism of carcinogenesis by human papillomavirus-16. *J Dermatol* 27(2):73-86.
32. Jin X, Wu X, Roth JA, Amos CI, King TM, Branch C, Honn SE, Spitz MR. (1995). Higher lung cancer risk for younger African-Americans with the Pro/Pro p53 genotype. *Carcinogenesis* 16(9):2205-2208.
33. Kalkan A, Ozdarendeli A, Bulut Y, Yekeler H, Cobanoglu B, Doymaz MZ. (2005). Investigation of Epstein-Barr virus DNA in formalin-fixed and paraffin- embedded breast cancer tissues. *Med Princ Pract* 14(4):268-271.
34. Kawaguchi H, Ohno S, Araki K, Miyazaki M, Saeki H, Watanabe M, Tanaka S, Sugimachi K. (2000). p53 polymorphism in human papillomavirus-associated esophageal cancer. *Cancer Res* 60(11):2753-2755.
35. Kesis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, Lorincz AT, Hedrick L, Cho KR. (1993). Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(9):3988-3992.
36. Khaled HM, Bahnassi AA, Zekri AR, Kassem HA, Mokhtar N. (2003). Correlation between p53 mutations and HPV in bilharzial bladder cancer. *Urol Oncol* 21(5):334-3341.
37. Klug WS, Cummings MR. (2002). *Genetik Kavramlar*. Çeviri Editörü: Prof. Dr. Cihan Öner. Palme Yayıncılık, Ankara.

38. Koushik A, Tranah GJ, Ma J, Stampfer MJ, Sesso HD, Fuchs CS, Giovannucci EL, Hunter DJ. (2006). p53 Arg72Pro polymorphism and risk of colorectal adenoma and cancer. *Int J Cancer* 119(8):1863-1868.
39. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. (2003). Robbins Temel Patoloji. Yedinci Baskı. Çeviri Editörü: Çevikbaş U. Nobel Tıp Kitapevleri.
40. Langerod A, Bukholm IR, Bregard A, Lonning PE, Andersen TI, Rognum TO, Meling GI, Lothe RA, Borresen-Dale AL. (2002). The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11(12):1684-1688.
41. Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden KH, Laimins LA. (1992). Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J* 11(8):3045-3052.
42. Lee YM, Leu SY, Chiang H, Fung CP, Liu WT. (2001). Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer. *J Microbiol Immunol Infect* 34(2):87-91.
43. Li T, Lu ZM, Guo M, Wu QJ, Chen KN, Xing HP, Mei Q, Ke Y. (2002). p53 codon 72 polymorphism (C/G) and the risk of human papillomavirus-associated carcinomas in China. *Cancer* 95(12):2571-2576.
44. Lin YY, Alphs H, Hung CF, Roden RB, Wu TC. (2007). Vaccines against human papillomavirus. *Front Biosci* 12:246-264.
45. Lu XM, Zhang YM, Lin RY, Liang XH, Zhang YL, Wang X, Zhang Y, Wang Y, Wen H. (2004). p53 polymorphism in human papillomavirus-associated Kazakh's esophageal cancer in Xinjiang, China. *World J Gastroenterol* 10(19):2775-2778.
46. Lung FW, Lee TM, Shu BC, Chang FH. (2004). p53 codon 72 polymorphism and susceptibility malignancy of colorectal cancer in Taiwan. *J Cancer Res Clin Oncol* 130(12):728-732.
47. Macdonald F, Ford CHJ, Casson AG. (2004). *Molecular Biology of Cancer*. Second Edition. BIOS Scientific Publishers, London and Newyork.
48. Migliavacca M, Ottini L, Bazan V, Agnese V, Corsale S, Macaluso M, Lupi R, Dardanoni G, Valerio MR, Pantuso G, Di Fede G, Tomasino RM, Gebbia N, Mariani-Costantini R, Russo A. (2004). TP53 in gastric cancer: mutations in the l3 loop and LSH motif DNA-binding domains of TP53 predict poor outcome. *J Cell Physiol* 200(3):476-485.

49. Munro AJ, Lain S, Lane DP. (2005). P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer* 92:434-444.
50. Murata M, Tagawa M, Kimura M, Kimura H, Watanabe S, Saisho H. (1996). Analysis of a germ line polymorphism of the p53 gene in lung cancer patients; discrete results with smoking history. *Carcinogenesis* 17(2):261-264.
51. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78(21):11451-11460.
52. Münger K, Howley PM. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 89(2):213-228.
53. Peixoto Guimaraes D, Hsin Lu S, Snijders P, Wilmotte R, Herrero R, Lenoir G, Montesano R, Meijer CJ, Walboomers J, Hainaut P. (2001). Absence of association between HPV DNA, TP53 codon 72 polymorphism, and risk of oesophageal cancer in a high-risk area of China. *Cancer Lett* 162(2):231-235.
54. Peng S, Tomson TT, Trimble C, He L, Hung CF, Wu TC. (2006). A combination of DNA vaccines targeting human papillomavirus type 16 E6 and E7 generates potent antitumor effects. *Gene Ther* 13(3):257-265.
55. Perez LO, Abba MC, Dulout FN, Golijow CD. (2006). Evaluation of p53 codon 72 polymorphism in adenocarcinomas of the colon and rectum in La Plata, Argentina. *World J Gastroenterol* 12(9):1426-1429.
56. Perez LO, Abba MC, Laguens RM, Golijow CD. (2005). Analysis of adenocarcinoma of the colon and rectum: detection of human papillomavirus (HPV) DNA by polymerase chain reaction. *Colorectal Dis* 7(5):492-495.
57. Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME. (2006). Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene* 25(11):1602-1611.
58. Reiss K, Khalili K. (2003). Viruses and cancer: lessons from the human polyomavirus, JCV. *Oncogene* 22(42):6517-6523.
59. Sambrook J, Russell DW. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. CSHL Press, New York.
60. Sastre-Garau X, Favre M, Couturier J, Orth G. (2000). Distinct patterns of alteration of myc genes associated with integration of human papillomavirus type 16 or type 45 DNA in two genital tumours. *J Gen Virol* 81(Pt 8):1983-1993.

61. Scartozzi M, Galizia E, Freddari F, Berardi R, Cellerino R, Cascinu S. (2004). Molecular biology of sporadic gastric cancer: prognostic indicators and novel therapeutic approaches. *Cancer Treat Rev* 30(5):451-459.
62. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 21;63(6):1129-1136.
63. Shen H, Solari A, Wang X, Zhang Z, Xu Y, Wang L, Hu X, Guo J, Wei Q. (2004). P53 codon 72 polymorphism and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Oncol Rep* 11(5):1115-1120.
64. Shepherd T, Tolbert D, Benedetti J, Macdonald J, Stemmermann G, Wiest J, DeVoe G, Miller MA, Wang J, Noffsinger A, Fenoglio-Preiser C. (2000). Alterations in exon 4 of the p53 gene in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 118(6):1039-1044.
65. Sjalander A, Birgander R, Hallmans G, Cajander S, Lenner P, Athlin L, Beckman G, Beckman L. (1996). p53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer. *Carcinogenesis* 17(6):1313-1316.
66. Soultzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. (2002). *Cancer Lett* 179(2):175-183.
67. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393(6682):229-234.
68. Strachan T, Read AP. (2004). *Human Molecular Genetics* 3. 3rd edition. Garland Science, New York.
69. Su L, Sai Y, Fan R, Thurston SW, Miller DP, Zhou W, Wain JC, Lynch TJ, Liu G, Christiani DC. (2003). P53 (codon 72) and P21 (codon 31) polymorphisms alter in vivo mRNA expression of p21. *Lung Cancer* 40(3):259-266.
70. Sul J, Yu GP, Lu QY, Lu ML, Setiawan VW, Wang MR, Guo CH, Yu SZ, Mu L, Cai L, Kurtz RC, Zhang ZF. (2006). P53 Codon 72 polymorphisms: a case-control study of gastric cancer and potential interactions. *Cancer Lett* 238(2):210-223.
71. Swan DC, Rajeevan M, Tortolero-Luna G, Follen M, Tucker RA, Unger ER. (2005). Human papillomavirus type 16 E2 and E6/E7 variants. *Gynecol Oncol* 96(3):695-700.
72. Tada M, Furuuchi K, Kaneda M, Matsumoto J, Takahashi M, Hirai A, Mitsumoto Y, Iggo RD, Moriuchi T. (2001). Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73?

Preferential selection of the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants. *Carcinogenesis* 22(3):515-517.

73. Thompson CH. (1997). Identification and typing of molluscum contagiosum virus in clinical specimens by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 53(3):205-211.
74. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324(1):17-27.
75. Wang YC, Lee HS, Chen SK, Chang YY, Chen CY. (1999). Prognostic significance of p53 codon 72 polymorphism in lung carcinomas. *Eur J Cancer* 35(2):226-230.
76. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. (2005). Colorectal cancer. *Lancet* 365(9454):153-165.
77. Wentzensen N, Ridder R, Klaes R, Vinokurova S, Schaefer U, Doeberitz MK. (2002). Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. *Oncogene* 21(3):419-426.
78. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248(4951):76-79.
79. Yi SY, Lee WJ. (2006). A p53 genetic polymorphism of gastric cancer: difference between early gastric cancer and advanced gastric cancer. *World J Gastroenterol* 12(40):6536-6539.
80. Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, Klimek F, Andersson S, Tommasino M. (2001). p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res* 61(2):608-611.
81. Zhang ZW, Laurence NJ, Hollowood A, Newcomb P, Moorghen M, Gupta J, Feakins R, Farthing MJ, Alderson D, Holly J. (2004). Prognostic value of TP53 codon 72 polymorphism in advanced gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 10(1 Pt 1):131-135.
82. Zhang ZW, Newcomb P, Hollowood A, Feakins R, Moorghen M, Storey A, Farthing MJ, Alderson D, Holly J. (2003). Age-associated increase of codon 72 Arginine p53 frequency in gastric cardia and non-cardia adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 9(6):2151-2156.

8. ÖZGEÇMİŞ

1977 Elazığ doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 1995 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım ve 1999 yılında mezun oldum. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım. 2001 yılında yüksek lisansımı tamamladım. Aynı yıl doktora başladım. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.