

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

(DOKTORA TEZİ)

**TEZİN ADI: MİDE KANSERLİ OLGULARDA TRAIL VE
TRAIL-DR4 GEN POLİMORFİZMLERİNİN VE TRAIL
SERUM DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

NAZLI CANER YANIK

**DANIŞMAN
PROF.DR. İLHAN YAYLIM**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

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

(DOKTORA TEZİ)

**TEZİN ADI: MİDE KANSERLİ OLGULARDA TRAIL VE
TRAIL-DR4 GEN POLİMORFİZMLERİNİN VE TRAIL
SERUM DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

NAZLI CANER YANIK

**DANIŞMAN
PROF.DR. İLHAN YAYLIM**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Yüregimin can köşesi KIZIM ve her zaman yanımda olduklarını bildiğim sevgili
AİLEME;

TEŞEKKÜR

Akademik tecrübesi ve bilimsel donanımı ile yolumu aydınlatan danışman hocam
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof.
Dr. İlhan YAYLIM'a,**

Tezim için gerekli hasta örneklerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı İstanbul
Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği'nden **Doç. Dr. Soykan
ARIKAN,** İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan **Prof.Dr. Filiz
AKYÜZ'e,**

Tezimin tamamlanmasında bilgi ve birikimlerini benimle paylaşmaktan imtina etmeyen
ve manevi desteklerini esirgemeyen sayın **Prof.Dr. Şakir Ümit ZEYBEK, Doç.Dr.
Özlem Timirci KAHRAMAN, Öğ.Üyesi. Yemliha Yıldız, Öğ.Gör. Mehmet
Tolgahan HAKAN, Dr. Öğr. Üyesi. Şeyda ERCAN, Dilara SÖNMEZ** başta olmak
üzere Moleküler Tıp Anabilim Dalı'ndaki kıymetli çalışma arkadaşlarıma

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, zorlu yollardan
geçerken inanç ve umut aşılayan, bana her zaman güven duyan sevgili aileme,

Teşekkür ederim.

Bu çalışma, "İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi" tarafından
desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-25435

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	II
BEYAN.....	III
İTHAF.....	IV
TEŞEKKÜR.	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XII
SEMBOLLER/ KISALTMALAR LİSTESİ	XIII
ÖZET	XVI
ABSTRACT	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.	3
2.1. MİDE KANSERİ ETYOPATOGENEZİ... ..	3
2.2 MİDE KANSERİ HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRMASI... ..	6
2.3. MİDE KANSERİ GELİŞİMİNDE SAPTANAN ÖNCÜ MUTASYONLAR.....	6
2.4. MİDE KARSİNOGENEZİNDE ROL OYNAYAN MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLER... ..	7
2.5. MİDE KANSERİ İLE İLİŞKİLİ TEK GEN DEĞİŞİKLİKLERİ.....	11

2.6. MİDE KANSERİ PATOGENEZİNİ ARAŞTIRMALARINDA TÜM GENOM ÇALIŞMALARI.....	13
2.7. MİDE KANSERLERİNDE MOLEKÜLER SINIFLANDIRMA.....	14
2.8. MİDE KANSERİ İLE GENETİK YATKINLIK İLİŞKİSİ... ..	19
2.9. MİDE KANSERİ İLE İLİŞKİLİ TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİ...21	
2.10. KANSERE YATKINLIKTAKİ BİYOBELİRTEÇ ADAYI GEN VARYANTLARININ İNCELENMESİ.....	25
2.11 TRAIL SİNYAL YOLAĞI.....	28
2.11.1. TRAIL Yapısı ve Reseptörleri.....	28
2.11.2. TRAIL Sinyal Aktarımı.....	30
2.11.3. TRAIL Molekülü Fizyolojik Görevleri	31
2.11.4. TRAIL Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi	31
2.11.5. TRAIL ile İlişkili İnterferonlar... ..	32
2.11.6. TRAIL ile İlişkili Tümör Supresör Genler ve Transkripsiyon Faktörleri	33
2.11.7. TRAIL Aktivitesinin İzoformlar Tarafından Düzenlenmesi	36
2.11.8. TRAIL Geninde Saptanan Tek Nükleotid Polimorfizmleri.....	36
2.11.9. Terapotik Hedef olarak TRAIL Reseptörü... ..	37
2.11.10.Kanserde TRAIL ile İndüklenen Apoptoza Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Gereç.....	39
3.1.1. Hasta Örneklerinin Toplanması	39
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	40

3.1.3. Kullanılan Kitler	40
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	41
3.1.5. Kullanılan Tampon Solüsyonları ve Çözeltiler	42
3.2. Yöntemler	44
3.2.1. DNA İzolasyonu	44
3.2.1.1. Tuzla Çöktürme Yöntemi İle DNA İzolasyonu	44
3.2.1.2. Kit İle DNA İzolasyonu	44
3.2.2. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	44
3.2.3. TRAIL C1595T Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması	46
3.2.3.1. TRAIL C1595T Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri	46
3.2.4. TRAIL DR4 Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması	46
3.2.4.1. TRAIL-DR4 C626G Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri	46
3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve PZR'ın Hazırlanışı	47
3.2.5.1. PZR Karışımının Hazırlanışı	47
3.2.5.2. PZR Koşulları	47
3.2.6. %2'lik Agaroz Jel Hazırlanması	49
3.2.6.1. PZR Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi	49
3.2.6.2. PZR Ürünlerinin Kontrolü	49

3.2.7. TRAIL 1595T Geni PZR Ürünlerinde RsaI Enzim Kesimi	50
3.2.7.1. RsaI Enzim Kesiminde Kullanılan Enzimler ve Kimyasal Maddeler:	50
3.2.7.2. RsaI Enzim Kesimi	51
3.2.7.3. %2'lik agaroz jel hazırlanması	
3.2.7.3. %2'lik AgaroZ Jel Hazırlanması	50
3.2.7.4. RsaI Enzim Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi.....	51
3.2.7.5 RsaI Enzim Kesim Ürünlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü.....	51
3.2.8. TRAIL-DR4 4.EKZON 3'UTR BÖLGESİNİN PZR ÜRÜNLERİNDE DraIII ENZİM KESİMİ.....	52
3.2.8.1. DraIII Enzim Kesiminde Kullanılan Enzimler ve Kimyasal Maddeler:.....	53
3.2.8.2. DraIII Enzim Kesimi	53
3.2.8.3. %2'lik AgaroZ Jel Hazırlanması	53
3.2.8.4. DraIII Enzim Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi	53
3.2.8.5 TRAIL DR4 C626G (rs4871857) Gen Polimorfizmi DraIII Enzim Kesim Ürünlerinin Değerlendirilmesi.....	53
3.3 TRAIL PLAZMA DÜZEYLERİ ELISA ÖLÇÜMÜ	54
3.3.1 Metod Prensipli.....	55
4. BULGULAR.....	55
4.1. PZR ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR.....	56

4.1.1. TRAIL C1595T PZR Ürünlerine Ait Bulgular	56
4.1.2. TRAIL DR4 C626G PZR Ürünlerine Ait Bulgular.....	57
4.1.3. TRAIL 1595T Kesim Ürünlerine Ait Bulgular.	57
4.1.4. TRAIL DR4 Kesim Ürünlerine Ait Bulgular	58
4.2. KLİNİK VE DEMOGRAFİK VERİLERİN İSTATİSTİK DEĞERLENDİRMESİ İLE ELDE EDİLEN BULGULAR.....	61
5. TARTIŞMA.....	70
6. KAYNAKLAR.....	75
ETİK KURUL KARARI.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	100
İNTİHAL RAPORU.....	101

TABLÖLAR LİSTESİ

1. Tablo 3.1: PZR Karışımının İçeriği	47
2. Tablo 3.2: TRAIL 1595T Gen Polimorfizmi PZR Reaksiyon Koşulları.....	48
3. Tablo 3.3: TRAIL DR4 Gen Polimorfizmi PZR Reaksiyon Koşulları.....	48.
4. Tablo 3.4: RsaI Enzim Kesimi İçeriği	50
5. Tablo 3.5: DraIII Enzim Kesimi İçeriği.....	52
6. Tablo 4.1: Çalışma Grubunun Yaş ve Cinsiyet Verileri	62
7. Tablo 4.2: Mide Kanseri Hastalarının Klinik Verileri	63
8. Tablo 4.3: Mide Kanseri Hasta ve Kontrol Grubunda TRAIL 1595 C/T Polimorfizmine Ait Genotip ve Allel Dağılımları	64
9. Tablo 4.4: Mide Kanseri Hasta ve Kontrol Grubunda TRAIL DR-4 C626G Polimorfizmine Ait Genotip ve Allel Dağılımları	66
10. Tablo 4.5: TRAIL 1595 C/T Polimorfizmi Genotiplerinin Hastaların Klinik Verileri Üzerinde Dağılımı	68
11. Tablo 4.6: TRAIL DR-4 626 C/G Polimorfizmi Genotiplerinin Hastaların Klinik Verileri uÜzerinde Dağılımı	69
12. Tablo 4.7: Hasta ve Kontrol Grubunda Plazma TRAIL Düzeyleri	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

1. Şekil 2.1: Mide Kanseri Gelişiminde Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar	8
2. Şekil 2.2: TRAIL-DR4 Kompleksi Kristal Yapısı	29
3. Şekil 2.3: TRAIL Aracılı Apoptotik Sinyal Mekanizması	31
4. Şekil 2.4: TRAIL Regülasyonunda Rol Oynayan Moleküller.....	33
5. Şekil 3.1: TRAIL C1595T Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü	51
6. Şekil 3.2: TRAIL DR4 G626C Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü	54
7. Şekil 3.3: TRAIL 1595 Geni PZR Ürünlerinin %3'lük Agaro Jeldeki Görüntüsü	56
8. Şekil 3.4: TRAIL DR4 626 Geni PZR Ürünlerinin %3'lük Agaro Jeldeki Görüntüsü	57
9. Şekil 3.5: TRAIL C1595T Kesim Ürünlerine Ait Bulgular	58
10. Şekil 3.6: TRAIL DR4 Kesim Ürünlerine Ait Bulgular	60

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

TNF-alfa: Tümör Nekroz Faktör Alfa

TRAIL: TNF ile İlişkili Apoptozu İndükleyen Ligand

TRAIL-DR4: TRAIL reseptörü

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi

CagA: Helicobacter Pylori Virülans Faktör Proteini

SHP-2: SH2 içeren Protein Tirozin Fosfataz

EBV: Epstein Barr Virüsü DNMT1: DNA Metil

Transferaz 1

PUMA: P53 ile upregüle olan apoptoz modülatörü

DICER1: RNaz motifli helikaz

IL-1RN: İnterloklin 1 reseptör antagonist

TNM: Tümör-lenf nodu-metastaz

CDKN1B: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1B

RARB: Retinoik asit reseptör beta

APC: Adenomatozis polipozis koli proteini

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

ERBB2: ERBB2 reseptör tirozin kinaz 2

FGFR2F: Endotel özgü fibroblast büyüme faktörü reseptörü

LOH: Heterozigozite kaybı

DCC: Deleted in colon cancer

CIMP: Kromozomal İnstabilite

TFF1: Trefoil Faktör 1

HST1: Histon deasetilaz 1

MSI: Mikrosatellit İnstabilite

RUNX3: Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 3

TGCA: Kanser Genom Atlas

CIN: Kromozomal İnstabilite

GS: Genom Stabil

TGF-BETA: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta

MSS: Mikrosatellit Stabil

RTK: Reseptör Tirozin Kinaz

CGH: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon

FISH: Floresans in-situ Hibridizasyon

LT: Lenfotaksin

HLA: İnsan Lökosit Antijeni

MUC1: Müsin1

GST: Glutasyon S Transferaz

COX2: Siklooksijenaz 2

MTHFR: Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

PCR-RFLP: Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluk Çeşitliliği

GWAS: Genom Çapında Bağlantı Çalışması

FADD: Fas ile ilişkili ölüm proteini

XIAP: X'e bağlı apoptoz proteini inhibitörü

IFN-GAMA: İnterferon gama

NFAT: Aktive edilmiş T hücre nükleer faktörü

PPAR-GAMA: Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör Gama

3-UTR: 3' Kodlanmayan Bölge

RBL: Retinoblastom benzeri protein

WBL: Lökosit parçalama çözeltisi

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

ÖZET

Mide kanseri yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden bir kanser türüdür. Patogenezinde çevresel ve genetik faktörler önemli rol oynamaktadır. Bu amaçla yapılan analizlerden “kansere yatkınlık” aday genler tespit edilmekte, polimorfizm çalışmaları ile gen varyantlarının kansere patogenezindeki önemi araştırılmaktadır. Çalışmalarda hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptotik süreçlere ait genler, metabolik enzimler, DNA onarımında yer alan proteinler ve inflamatuvar süreçlerde görev yapan mediatörlerdeki genetik varyasyonların hastalık yatkınlığında ve prognozunda önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada, apoptotik süreçte rol oynayan TRAIL ve reseptörü TRAIL-DR4 gen varyantları ile hastalığın klinik karakteristikleri ve hastalık yatkınlığı arasındaki ilişki incelenmiştir. Çalışmamızda TRAIL 1595C/T ve TRAIL-DR4 C626G genotip frekansları incelenmiş olup, “mide kanserli olgular” ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,256$, $p>0,189$). Hasta grubunda CC genotip frekansı sıklığı (%60), en yüksek olarak bulunmuştur. TRAIL-DR4 C626G GG ve GC “genotip frekans sıklığı” (%40) eşit olarak saptanmıştır. Genotip frekansları arasında klinik parametreler (tümör evresi, lenf nodu tutulumu, uzak metastaz, perinöral invazyon) açısından fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Hasta-kontrol grupları serum TRAIL düzeyleri arasında fark bulunmamıştır ($p>0,33$). Literatürde çalışma sonuçları arasında farklılıklar mevcuttur. Daha geniş hasta grubunda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

“Anahtar Kelimeler”: “Mide Kanseri, TRAIL, TRAIL-DR4, Gen Varyantı”

Bu çalışma, “İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi” tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-25435

ABSTRACT

Gastric cancer is a type of cancer with high mortality and morbidity. Environmental and genetic factors play an important role in its pathogenesis. For this purpose, genes that are candidates for "cancer susceptibility" are determined, and the importance of gene variants in cancer susceptibility is investigated by polymorphism studies. In studies, it has been determined that genes belonging to cell proliferation, differentiation and apoptotic processes, metabolic enzymes, proteins involved in DNA repair, and genetic variations in mediators involved in inflammatory processes play an important role in disease susceptibility and prognosis. In this study, the relationship between TRAIL and its receptor TRAIL-DR4 gene variants, which play a role in the apoptotic process, and the clinical characteristics of the disease and disease susceptibility were investigated. In our study, TRAIL 1595C / T and TRAIL-DR4 C626G genotype frequencies were examined, and no significant difference was found between "gastric cancer cases" and the control group ($p > 0.256$, $p > 0.189$). The frequency of CC genotype frequency (60%) was found to be the highest in the patient group. TRAIL-DR4 C626G GG and GC "genotype frequency frequency" (40%) were determined to be equal. There was no difference between genotype frequencies in terms of clinical parameters (tumor stage, lymph node involvement, distant metastasis, perineural invasion) ($p > 0.05$). No difference was found between serum TRAIL levels of patient and control groups ($p > 0.33$). There are differences in the results of the studies in the literature. Studies on a larger patient group is needed.

“Key words”: “Gastric cancer, TRAIL, TRAIL-DR4, Gene Variant”

The present work was supported by the “Research Fund of Istanbul University”. Project No. TDK-2017-25435

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mide kanseri, yılda yaklaşık 900.000 kişinin tanı aldığı, dünyada 3. en sık görülen kanser türüdür. Mide kanseri genetik ve çevresel etkenlerin vasıtasıyla ortaya çıkabilen bir kanser türüdür. Mide kanseri geç klinik bulgu veren, morfolojik ve genetik olarak heterojen bir kanser türüdür. Etyolojisinde sigara tüketimi, yaş, H. pylori enfeksiyonu, obezite, karbonhidrat ve yağdan zengin beslenme, yüksek tuz ve nitratlı gıda tüketimi gibi çevresel faktörler yer alır. Mide kanseri oluşumunda rol alan genetik faktörler olarak ise; gen kopya sayısı değişiklikleri, gen mutasyonları, yapısal varyantlar, epigenetik değişimler, mRNA ve kodlama yapmayan RNA'ların transkripsiyon farklılıkları saptanmıştır. Yeni nesil sekanslama (NGS) çalışmaları ile mide kanserlerinin %15-20'sinde mikrosatellit instabilite varlığı gösterilmiştir. Mide kanseri moleküler karakteristiğinin ortaya konması ve süreçlere özgü biyomarkerların geliştirilmesi, yüksek riskli hastaların belirlenmesi, erken evrede tanı, en uygun tedavi seçimi ve tedavi yanıtının izlenmesi aşamalarında klinik yarar sağlayacaktır. Günümüzde global gen ekspresyon profillemesine olanak sağlayan microarray teknolojisi, NGS gibi metodların gelişmesi ile kanser oluşumunda rol oynayan genetik değişimleri saptamaya yönelik çalışmalar sürmektedir (1,2).

Yapılan çalışmalarda; mide mukozası koruyucu genleri, metabolik enzim genleri, immün yanıt ilişkili genler, DNA tamir genleri ve tümör supressör genlerdeki yapısal değişikliklerin “mide kanseri” patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir. Gen varyantlarının kanser etyolojisinde yer alan çevresel faktörlerle etkileşimini düzenleyen biyolojik süreçlere ait moleküler mekanizmaların mide kanserine yatkınlık temelinde araştırılması oldukça önemlidir. “Genetik polimorfizmlerin” mide kanseri gelişimine etkisini inceleyen araştırmalar, mide kanseri gelişimi riski taşıyan bireylerde erken tanı ve tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi çalışmalarına kaynak teşkil edebilir. Bu konudaki bilimsel veriler heterojen olmasının temel nedenlerinden birinin çeşitli kanser tiplerindeki etyolojik ve toplumlar arası farklılıklar olduğu ileri sürülmektedir (3).

“TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand” (TRAIL)/APOL2”, 32,5 kDa ağırlığında, 281 aminoasit dizisinden oluşan TNF-alfa süperaillesinden, tip 2 transmembran glikoproteindir. Mide kanseri oluşumunda rol alan moleküler yollarda TRAIL-TNF

ilişkisi apoptoz indükleyici ligand (TRAIL/APOL2), TNF-alfa süper ailesinden tip transmembran glikoprotein olup DR4 ve DR5 reseptörler aracılığıyla apoptotik etki gösterdiği bilinmektedir. Apoptozun ekstrinsik yolu “TRAIL ligandı” ile indüklenen ölüm reseptörleri aracılığı ile gerçekleşir. TRAIL sinyal yolağında yer alan moleküllerin yapısal değişim ve fonksiyonlarının değerlendirilmesi, sinyal iletim mekanizmasının ve ilişkili olduğu düzenleyici yolların aydınlatılması; tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (4).

Literatürde pek çok kanserde TRAIL ve ilişkili olduğu reseptörlerin genetik varyantlarının hastalık riski ve prognozu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Mide kanserinde TRAIL ve ilgili yolların gen polimorfizmleri ve kanda TRAIL düzeylerinin birarada araştırıldığı çalışma bulunmamaktadır (5).

Yapılan çalışmalarda “TRAIL ve reseptörü TRAIL-DR4” gen varyantları meme, kolorektal, mesane, larinks, “akciğer kanseri” ile ilişkili bulunmuştur (6,7,8).

Çalışmanın amacı, mide kanserli olgularda klinik bulgular, histopatolojik değişkenler ve hastalık prognozu ile TRAIL ve reseptörü TRAIL-DR4 genotipleri ve serum TRAIL düzeyleri arasındaki olası ilişkinin incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

Mide kanseri sıklıkla Güney Amerika ve Asya’da görülmekle birlikte global olarak kansere bağlı ölüm nedenleri arasında 5. sırada yer almaktadır. Yıllık yaklaşık olarak 1.000.000 yeni vaka saptanmakta ve 738.000 mide kanseri kaynaklı ölüm meydana gelmektedir. Son yıllarda “mide kanseri insidansı” ve mortalite oranlarında kademeli bir azalma saptanmasına rağmen popülasyondaki yaşlanma ile birlikte görülen yeni vaka sayısında artış olmuştur (9).

2.1. MİDE KANSERİ ETYOPATOGENEZİ

Mide kanseri etyopatogenezinde çevresel, mikrobiyal ve genetik faktörler rol oynamaktadır.

2.1.1. Çevresel ve Mikrobiyal Faktörler

2.1.1.1. Beslenme ve Diyet Özellikleri

Geleneksel diyetle göre yüksek tuz tüketimi (salamura besinler, tuzlanmış balık gibi) diyetle ilgili atrofik gastrit nedenlerinin başında yer alır. Düşük lif içerikli diyet, azalmış sebze ve meyve (düşük C vitamini) tüketimi, nitrat içeren salam, pastırma gibi gıdalar de risk faktörlerindedir. Son çalışmalara göre demir eksikliğinin mide kanseri için risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Demir azlığı, H. pylori virülansını çoğaltarak kanser gelişimini hızlandırdığı saptanmıştır (10).

2.1.1.2. “Helicobakter Pylori (H. Pylori) Enfeksiyonu”

H. pylori enfeksiyonu en belirgin çevresel faktör olup, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından sınıf 1 karsinojen olarak tanınmaktadır. H. Pylori virülans faktörü sitotoksin ilişkili gen A (CagA) ‘dır ve patojenite kaynağı bakteriyel cag mide epitel hücrelerinde mikrobiyal kolonizasyonu sağlar. Transgenik fare çalışmalarında sistemik CagA ekspresyonunun mide epitelinde hiperplazi, gastrik polip oluşumuna, mide ve intestinal adenokarsinomlarına neden olduğu gösterilmiştir. CagA genetik varyantları insanlarda kronik gastrit zemininde kanser nedenidir. CagA mide epitel hücrelerinde Src kinazlarca fosforilasyona uğrayarak SHP-2’yi (Src homology 2- containing tirozin kinaz)

aktive eder. SHP-2 aktivasyonu da hücre büyümesi, migrasyonu ve adezyonu süreçlerinin önemli sinyal yollarından Ras-ERK yolunu aktifler. Apoptozu inhibe eder, hücre proliferasyonunu artırır (11). CagA ayrıca, hücreler arası sıkı bağlantıları bozarak apikal bazolateral hücre polaritesini değiştirerek mide mukozal organizasyonunu bozar. E-cadherin ile etkileşerek, molekülün beta- katenin ile bağlanmasını bozar, beta-katenin nükleusta birikerek beta-katenin bağımlı transkripsiyon yollarını aktive eder. H. pylori ayrıca reaktif oksijen yapımını aktifler, bireyin “antioksidan savunma mekanizmalarını” baskılar ve oksidatif DNA hasarına yol açar (12,13).

2.1.1.3. Sigara

Sigara kullanımının vaka kontrol ve kohort çalışmalarda mide kanseri riskini 1,5-2,5 kat artırdığı gösterilmiştir. Kullanım sıklığı ve süresi ile risk artmaktadır. Sigaradaki nitrozamin ve diğer nitroz bileşenlerin mutajenik etkileri vardır (14).

2.1.1.4. Epstein-Barr Virüs (EBV)

“EBV enfeksiyonu” %5-10 mide kanseri olgusunda saptanmış olup, erkeklerdeki kardiya tümörlerinde görülmektedir. EBV nedenli mide kanserlerinin majör moleküler özelliği; kanser ilişkili genlerin CpG adaları promoter bölgelerinde metilasyon varlığıdır. EBV viral latent membran proteini 2A (LMP2A); STAT3 fosforilasyonunu takiben gerçekleşen DNA metiltransferaz (DNMT1) transkripsiyonunun indüklenmesi yoluyla oluşan DNA metilasyonundan sorumludur. EBV ayrıca, apoptoz regülasyonunda rol oynayan çok sayıda miRNA’yı kodlar. Bu miRNA’lar; p-53 ile upregüle olan apoptoz modülatörü (PUMA), DICER1 ve BIM gibi hücrel proteinlerin ekspresyonlarının downregüle edilmesinde görev alırlar (15).

2.1.1.5. Radyasyon Maruziyeti

Farklı tip kanserlerin (Testis ca, Hodgkin lenfoma gibi) tedavisi için radyoterapi alanlar mide kanseri gelişimi için risk altındadır.

2.1.1.6. Cerrahi girişimler

Subtotal gastrektomi, gastroenterostomi, Billroth operasyonları geçirenlerde hipoklorhidri ve sekonder hipergastrinemi nedeniyle gelişen mide mukozası erezyonu

ve atrofi ile inflamatuvar değişiklikler nedeniyle normal popölasyona göre daha fazla mide kanseri görülür (15).

2.1.2. Genetik Faktörler

2.1.2.1. İmmün Sistem İlişkili Varyasyonlar

İlk tespit edilen birey kaynaklı genetik faktör proinflamatuvar İnterlökin 1-beta geni polimorfizmleri olmuştur. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada; “İnterlökin 1-beta (IL-1B)”, “İnterlökin 1 Reseptör Antagonist (IL-1RN)”, Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) gibi immün sistemle ilişkili genlerin “tek nükleotid polimorfizmlerinin” (SNP) *H. pylori* ile enfekte kişilerde mide kanseri gelişmesinde risk faktörü oldukları gösterilmiştir. Bu bulgular; “*H. pylori* enfeksiyonunu” takiben mide kanseri gelişiminde konak immünitesinin kritik rol oynadığını vurgulamaktadır (16).

2.1.2.2. Kalıtsal Sendromlar

Kalıtsal mide kanseri sendromları tüm olguların %1-3’ü kadardır. Ailesel diffüz tip, adenokarsinom/ mide proksimali polipleri zemininden gelişenler ile ailesel intestinal mide kanserleri olmak üzere 3 tiptir. “Hereditör diffüz tip kanser” (HDGC) gelişiminde E-kaderin (CDH1) germline mutasyonları rol oynar. CDH1 yanında yeni tanımlanan HDGC aday genleri CTNNA1, BRCA2 ve STK11’dir (17).

Mide kanseri ayrıca; Lynch sendromu, “hereditör nonpolipozis kolorektal kanser sendromu”, “ailesel adenomatöz polipozis” ve “Li-Fraumeni sendromu” gibi ailesel kanser sendromları ile de ilişkilidir (17).

2.1.3. Diğer Faktörler/ Predispozan Lezyonlar

Mide kanseri gelişiminde diğer risk faktörleri; “gastrik adenomlar”, özofajit, pernisiyöz anemi, “benign gastrik ülserler”, adenomatöz polip varlığıdır.

2.2. “MİDE KANSERİ HİSTOPATOLOJİK SINIFLAMASI”

Mide kanseri vakalarının yaklaşık %95'i adenokarsinom olup yapılan epidemiyolojik çalışmalarda köken aldıkları anatomik bölgeye göre kardiya/proksimal-nonkardiya/distal; histolojik fenotipe göre (Lauren sınıflaması) intestinal, diffüz ve miks tip olarak sınıflandırılırlar. TNM evrelemesinden bağımsız olarak proksimal mide kanseri olgularında sağkalım oranları daha düşüktür. Distal mide kanserleri erkeklerde daha sık görülür, sporadik gelişir, “H. pylori enfeksiyonu” ile ilişkilidir ve çoğunlukla intestinal tiptir. “Mide kanseri insidansının” gerilemesi “H. pylori prevalansı” ile intestinal ve distal mide kanseri olgularının görülme sıklığındaki azalma ile ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte difüz tip mide kanseri tek tip coğrafi dağılım gösterirken; Asya, Doğu Avrupa, Güney Amerika gibi yüksek riskli bölgelerde intestinal mide kanseri sıklığı yüksektir. Diffüz tip kanser gençlerde ve kadınlarda görülmekte olup, yüksek metastaz, hızlı progresyon ve “kötü prognoza” sahiptir (18).

2.3. MİDE KARSİNOGENEZİNDE ÖNCÜ MUTASYONLAR

Mide kanseri gelişiminde intestinal metaplazi-adenom-kanser sıralamasıyla kademeli olarak gerçekleşen bir dizi histolojik ve moleküler değişim rol oynamaktadır.

TP53 ve CDH1 gen mutasyonları mide kanseri moleküler patogenezindeki öncü değişikliklerdir. “Oksidatif stres”, “iyonize radyasyon” gibi nedenlere karşı meydana gelen DNA hasarının onarılmasına izin verecek şekilde hücre döngüsünü durdurarak genom bütünlüğünün korunmasından sorumlu olan tümör supressör özellikli P53 geninde sıklıkla “fonksiyon kaybı mutasyonlar”, heterozigozite kaybı, nadiren metilasyon meydana gelmektedir. Fonksiyon kaybına yol açan “p53 mutasyonları” mide kanserinde en sık meydana gelen değişikliktir. Kromozomal instabiliteye sahip olguların %70’inde p53 mutasyonları saptanmıştır (18).

Mide kanserli olgularda en sık meydana gelen 2. değişiklik bir “hücre adezyon molekülü” olan E-cadherin’i kodlayan CDH1 genindeki mutasyonlardır. CDH1 mutasyonları diffüz histolojik pattern ile ilişkilidir. CDH1 germline mutasyonlarına otozomal dominant herediter diffüz mide kanseri olgularında sık rastlanır. TCGA

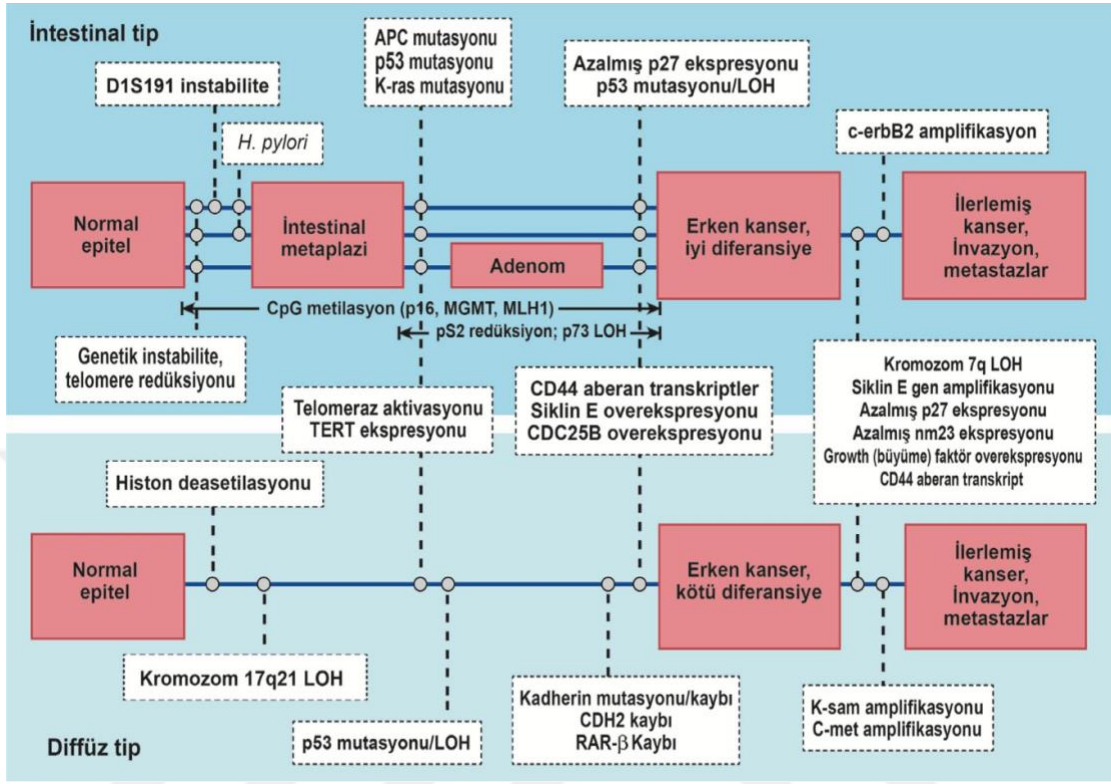
çalışmalarında, mide kanserli olguların %11'inde "CDH1 mutasyonu" olduğu gösterilmiştir. Ayrıca genomik stabiliteye sahip mide kanserli olguların %37'sinde de CDH1 mutasyonu saptanmıştır (19).

"Yeni jenerasyon sekanslama çalışmaları" bu sık rastlanan iki mutasyonun mide kanseri patogeneziindeki rolünü ortaya koymakla birlikte, henüz bu mutasyonlara sahip bireylere özgü bir tedavi rejimi mevcut değildir (20).

2.4. MİDE KARSİNOGENEZİNDE ROL OYNAYAN DİĞER MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLER

1992'de Correa tarafından önerilen "çok basamaklı mide karsinomu modelinde", intestinal tip mide karsinomu gelişim sürecinin aşamalı histolojik değişikliklerle başladığı gösterilmiştir. Bu aşamalar sırasıyla, kronik gastrit- atrofi-intestinal metaplazi ve son olarak mide kanseri ile sonuçlanan displazidir. Mide karsinomu modelinde histolojik değişimlerin yanısıra moleküler anormallikler de yer almaktadır. Başlangıç aşamalarında "genomik instabilite", "telomeraz inaktivasyonu", TP53 kaybı/mutasyonu, "tümör supressör genlerin inaktivasyonu" ve "CpG adacıklarında metilasyon" meydana gelir (21).

"İntestinal metaplazi", TERT aktivasyonu, "retinoik asit reseptör- β (RAR β) ekspresyonu" kaybı, TP53 overekspresyonu ve anormal düzeyde CD44 transkriptleri varlığı ile karakterizedir. Mide adenomlarında sağlıklı dokuya oranla CDKN1B ekspresyonu azalmıştır, CCNE1 overeksprese edilir, APC geninde mutasyon varlığı izlenir. İleri evre mide kanserinde ise TGF- β ekspresyonunda azalma, p27 fonksiyon kaybı ve " tirozin kinaz reseptör gen mutasyonları" (EGFR, ERBB2, ERBB3), VEGFA, PIK3CA ve "KRAS/NRAS amplifikasyonları" ve "kromatin remodelling" (ARID1A, MLL3, MLL) gen mutasyonları gibi değişiklikler meydana gelmektedir (22) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Mide Kanseri Gelişiminde Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar (22)

Diffüz tip adenokarsinom *H. pylori* enfeksiyonu ile ilişkili değildir ve intestinal tip hücrelerden daha fazla sayıda bulunan kötü diferansiye hücreli mide mukozasından kökenlendiği düşünülmektedir. Temel değişiklik olarak “mikrosatellit instabilite”, CDH1 mutasyon veya delesyonları sonucu e-katherin fonksiyon kaybı, “MDM2 amplifikasyonu” ve MET, RHOA, FGFR2F mutasyonları izlenir (22,23).

Günümüzde, Correa modelinde görülen genetik ve epigenetik değişimlerin sekansiyel olup olmadıkları, bazı histolojik değişikliklerin direkt olarak mide kanseri nedeni olup olmadığı net değildir (24). Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda mide karsinogenezi ile ilişkili yeni genetik değişiklikler keşfedilmeye devam etmektedir.

Mide karsinogenezinde rol oynadığı gösterilen moleküler anormallikler; mikrosatellit instabilite, “onkogenik aktivasyon”, tümör supressör genlerde inaktivasyon ve telomer reaktivasyonudur (25,26).

2.4.1. Tümör süpressör genlerin inaktivasyonu

Tümör süpressör genlerin mutasyonlar veya heterozigozite kaybı (LOH) nedenli inaktivasyonu gastrik karsinogeneizde sık rastlanan genomik anormalliklerdir. Diffüz ve intestinal tip mide kanserlerinde p53 ve p16 gen inaktivasyonlarına sık rastlanmaktadır. APC geninin de sıklıkla intestinal tip mide kanserinde inaktive olduğu gösterilmiştir. Frajil histidin triad (FHIT) ve kolon kanserinde delesyona uğrayan gen (DCC) mide kanseri patogenezinde sıklıkla değişime uğradığı gösterilmiştir (27).

Mide kanserli olguların %80'inde, histolojik alt tipten bağımsız olmakla birlikte sıklıkla metastatik mide tümörlerinde P53 geninde LOH ve mutasyon saptandığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda p53'ün erken karsinogeneizde özellikle metaplazi-displazi dönüşüm sürecinde önemli rol oynadığı ve bu değişimin diffüz mide kanserinde tümör progresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (28,29).

İntestinal tip mide kanserlerinin yaklaşık %60'ında ve adenom olgularının %25'inde APC tümör süpressör geninde LOH ve mutasyon olduğu gösterilmiştir (30, 31). Bu değişiklikler diffüz tip karsinomlarda nadir görülür. Bir çalışmada, APC geni somatik mutasyonlarının gastrik adenom ve displazi patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (32). Fakat bu değişimlerin mevcut adenomların adenokarsinoma ilerlemesindeki etkileri kısıtlıdır. APC proteini beta katenine spesifik olarak bağlanarak degradasyonunda görev alır. İntestinal tip mide kanserlerinde beta katenin mutasyonları saptanmıştır. Hücre içi düzeyi sıkı kontrol altında olan beta katenin proteininin APC mutasyonlarına bağlı olarak hücre içinde birikmesi sonucu LEF-1 transkripsiyon faktörü ile etkileşerek nukleusa transloke olmasıyla, hücre çoğalması ve büyümesi ile ilişkili sinyal yollarındaki genlerin ekspresyonlarında değişiklik meydana gelir (33).

Mide kanseri olgularının yaklaşık %40'ında p16 geni promotörü CpG adacıklarında hipermetilasyon olduğu gösterilmiştir. Bu olgular MSI-H fenotipine sahiptir. Promoterların anormal metilasyonu bazı genlerin ekspresyonlarının susturulmasına neden olur. CpG adacık metilatör fenotipine sahip (CIMP) mide kanseri olgularında sıklıkla p16 ve hMLH1 genlerinde metilasyon varlığı gösterilmiştir. Bu fenotipe sahip tümörlerin CIMP- negatif olgulardan farklı moleküler özelliklere sahip olmaları mide kanseri patogenezinde alternatif yolların yer aldığını düşündürmektedir. Bu değişikliklerin normal mide mukozasında da meydana gelmesi, bunların mide

karsinogenezinin erken evredeki moleküler izlerinden olduklarını düşündürmektedir (34).

FHIT geni, 3p14.2 geninin yaygın kırılğan bölgesi olan FRA3B alanından izole edilmiş bir “tümör supressör gendir”. Mide kanserli olguların yaklaşık yarısında ekson delesyonu nedeniyle anormal gen transkriptlerinin varlığı gösterilmiştir (35).

DCC tümör supressör geni 18q kromozomunda yer alır. İyi diferansiye mide kanserlerinde DCC gen lokusunda sıklıkla LOH değişiminin olduğu saptanmıştır. 52 mide kanserli olguda yapılan bir çalışmada genin azalan ekspresyonu karaciğer metastazı ile dolayısıyla kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (36).

Trefoil faktör ailesi 1(TFF1), 21q22 kromozomunda yer alan antiproliferatif ve antiapoptotik olmak üzere dual özellikte bir gendir. TFF1, gastrointestinal mukozayı zararlı ajanlara karşı fiziksel bariyer olmasıyla koruyan mukus tabakasının bir stabilizörüdür. Yapılan bir çalışmada, mide kanserli olguların %44’ünde TFF1 gen delesyonu ve/veya mutasyonu nedeniyle “ekspresyon kaybı” saptanmıştır (37,38).

2.4.2. Onkogenik aktivasyon

Bu grupta yer alan genler sıklıkla büyüme faktörlerini ve onların reseptörlerini kodlayan genlerdir. Örneğin, hepatosit büyüme faktörüne ait bir “ tirozin kinaz reseptörünü “kodlayan c-met protoonkogeni, diffüz ve intestinal tip mide kanserli olguların %50’sinde overexpres olmaktadır. Bu olgularda invazyon olasılığı daha sıktır, tümör kötü diferansiyedir ve “prognoz kötüdür” (39).

C-erB2(HER-2/neu) protoonkogeni transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. Tüm gastrointestinal sistem malignitelerinin ¼’ünde c-erB2 overexpresyonu ve gen amplifikasyonuna rastlanmaktadır (40). Mide kanseri olgularında c-erB2 overexpresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (41).

Mide kanserli olgularda Siklin E, c-erbB3, K-sam, Ras, c-myc gibi diğer protoonkogenlerin de amplifikasyonu ve overexpresyonu gösterilmiştir (94,96). Yapılan çalışmalarda özellikle fibroblast büyüme faktörü reseptör ailesi üyesi olan K-sam geninin

amplifikasyon sonucu diffüz tip mide kanserli olgularda overexpresse olduğu saptanmıştır (42,43,44).

Ek olarak, sıklıkla intestinal tip ileri evre mide kanseri olgularında Ras ekspresyonunda artış saptanmıştır. Mide kanseri olgularında saptanan diğer bir onkogenik değişim ise, hastalık evresi, invazyon ve peritoneal disseminasyon ile ilişkili bulunan c-myc geni ekspresyon artışıdır (45).

2.4.3. Telomeraz reaktivasyonu

Telomerler kromozom uçlarında bulunan ve kromozomal bütünlüğün korunmasında önemli rol oynayan nükleotid dizileridir (46). Normal hücrelerde mitotik bölünme süreçlerini kontrol eder ve her bölünme döngüsünde uzunluğu kısalır. Kök hücrelerde telomer uzunluğu telomeraz enzimi tarafından korunur. Transforme hücrelerde ise telomeraz yeniden aktive edilerek telomerler yenilenir. Bu enzimin aktive olması ile kromozomların 3' uçlarına TTAGGG dizisi eklenir. Bununla birlikte hücreler fizyolojik senesense girmez ve dönüşüm kapasitesine sahip olur. Telomer kısalması genetik instabiliteye neden olabilir. Mide kanseri erken evre değişikliklerinden olan intestinal metaplazide telomer kısalığı saptanmıştır (47,48). Ayrıca birçok malignitede de telomeraz reaktivasyonu olduğu gösterilmiştir (49).

2.5. MİDE KANSERİ İLE İLİŞKİLİ TEK GEN DEĞİŞİKLİKLERİ

Mide kanseri patogeneğinde rol oynayan moleküler mekanizmaların anlaşılması için yapılan çalışmalarda birçok gen analiz edilmiştir. Tanısal ve prognostik değeri olan belirteçlerin saptanması ve tedavide potansiyel hedef olabilecek genlerin tanımlanması bu çalışmaların temel amaçlarından (50).

Hepatosit büyüme faktörünü bağlayan bir transmembran tirozin kinaz reseptörünü kodlayan MET geninde, diffüz tip mide kanseri olgularında intestinal tipe göre daha yüksek oranda amplifiye olduğu gösterilmiş olup, tümör evresi ve klinik sonuçlarla ilişkili bulunmuştur. Kore'de yapılan bir çalışmada mide kanserli olguların %21'inde saptanan MET geni amplifikasyonu "düşük sağkalım oranları"(kötü prognoz) ile ilişkili bulunmuştur (51).

Bir çalışmada; Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 2(FGFR2)'nin diffüz tip kanserde yüksek oranda amplifiye olduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise FGFR2 geni overexpresyonu kötü prognozun bağımsız bir belirteci olarak bulunmuştur. Fibroblast Büyüme Faktörü 4 (HST1), 1986'da yapılan bir çalışmada mide kanseri ile ilişkilendirilen ilk onkogen olmuştur. Özellikle undiferansiye ileri evre metastatik mide kanseri olgularından yüksek düzeyde amplifikasyona uğramıştır (52).

İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü (HER2), bilinen ligandı olmayan bir tirozin kinaz reseptör genidir, İntestinal tip mide kanserli olguların %27'sinde amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu gösterilmiştir. Sağkalım ile ilişkisini ele alan çalışma verileri henüz yetersizdir. Son yapılan TOGA çalışmasında; HER2 pozitifliğinin transtuzumab tedavisine yanıt için öngördürücü olduğu saptanmıştır (53).

İyi diferansiye intestinal tip mide kanserli olguların %5'inde KRAS geni 12 ve 13. kodonunda mutasyon saptanmıştır. Kolorektal kanserden farklı olarak; MSI'si olan mide kanseri olgularında KRAS mutasyonu daha sık gözlenmektedir.

P53 hücre döngüsü, DNA hasarı tamiri, apoptoz süreçlerinde yer alan nükleer bir proteindir, mide kanseri olgularında sıklıkla heterozigote kaybı veya mutasyonlar nedeniyle inaktive durumdadır. Mide kanserli olguların %60'ında p53 mutasyonları saptanmıştır (53).

APC proteini; Wnt sinyal yolağında yer alan beta-katenin, aksin ve hücre iskeleti düzenleyicisi E1 gibi birçok yolağa ait proteinle bağlanma bölgesi içerir. APC hücre adezyonunda, migrasyonunda, mitotik iplikçik oluşumunda ve kromozomal segregasyonda majör rol oynar (54). APC gen mutasyonları; mide kanserinde ikinci en sık görülen genetik değişimdir. Orta ve yüksek düzeyde diferansiye intestinal tip mide kanseri olgularının %30-40'ında bu mutasyonun varlığı saptanmıştır. APC mutasyonları ayrıca kanser gelişiminin öncül lezyonlarında, mide adenomlarında, intestinal metaplazide de görülmektedir (55).

RUNX3, apoptoz, hücre büyümesi ve anjiogeneze rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Mide kanserli olguların %50'sinde ekspresyonu gösterilmiştir. Promoter bölgedeki hipermetilasyon sonucu RUNX3 inaktivasyonu gerçekleşmektedir (55).

2.6. MİDE KANSERİ PATOGENEZİ ARAŞTIRMALARINDA TÜM GENOM ÇALIŞMALARI

Günümüzde; mide kanseri gelişiminin moleküler seviyede anlaşılması, histopatolojik tanı ve prognoz ile ilişkilendirilmesi amacıyla yüksek verimli modern moleküler metodların kullanıldığı bilimsel çalışmalar yapılmaktadır.

Zang ve arkadaşları; 15 mide adenokarsinomu vakasında yaptıkları exom sekanslaması sonucuna göre çoğunluğu kromatin yeniden düzenlemesi ve hücre adezyonunda görev alan genler olmak üzere birçok gende ortalama 50 mutasyon saptamışlardır. Ek olarak, iki önemli tümör supressör gen olan FAT4 ve ARID1A genlerindeki mutasyonlar ile mide kanseri arasında ilk defa bir ilişki olduğunu tespit etmişler (56).

Mide kanserinde yüksek düzeyde inflamatuvar ve stromal hücre bulunması nedeniyle tüm genom ekspresyon profillemesi yapılması zordur. Kontaminant hücrelerin interferansını elimine etmek amacıyla Tan ve arkadaşları geniş seride mide kanseri hücre hatlarında gen ekspresyon profillemesi çalışmaları yapmışlar ve iki majör genomik alt tip tespit etmişlerdir. Bu gruplara ait hastaların Lauren sınıflamasına göre yapılan fenotipleri ile genotipleri arasında %64 düzeyinde uyum saptamışlardır. Çalışmada ayrıca mide kanseri hücre hatlarında yapılan genotip temelli sınıflamanın tedavi cevabı için öngördürücü ve prognostik değeri olduğunu göstermişlerdir (57).

Mide kanserinde dokudan izole edilen RNA kullanılarak yapılan bir tüm genom ekspresyon çalışmasında; stroma ilişkili genlerdeki yüksek ekspresyon düzeylerinin kötü prognoz ile ilişkili olduğunu tespit edilmiştir (58).

“Yüksek çözünürlüklü SNP dizileme metodu” kullanılarak gerçekleştirilen genom çapında kopya sayısı profillemesi çalışmalarında; mide kanserli olguların yaklaşık %37’sinde hedefe yönelik moleküler tedavilerde kullanılabilecek FGFR2, HER2, EGFR, MET gibi tirozin kinaz reseptör proteinlerinde yüksek düzeyde amplifikasyon olduğu gösterilmiştir. Mide kanserinin moleküler heterojenitesi nedeniyle tümöre özgü moleküler profillemesi çalışmalarının yapılması yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir (59, 60).

2.7. MİDE KANSERLERİNDE MOLEKÜLER SINIFLANDIRMA

Mide kanseri gelişiminde genetik olarak karmaşık ve heterojen mekanizmalar yer almaktadır. Mide kanseri ile ilişkili genomik değişimlerin ortaya konması tanı, tedavi ve prognoz süreçlerine olumlu katkı sağlayacaktır. Bu amaçla tüm genomda ekspresyonu ve gen kopya sayısı değişimlerini araştıran çalışmalar yapılmaktadır (61,62).

Kanser Genom Atlası (TCGA) projesi, mide kanseri moleküler karakteristiklerini aydınlatmayı amaçlayan, bireysel tedavi uygulamalarının gelecekteki klinik kullanımlarına ilişkin yeni stratejilerin geliştirilmesini destekleyecek çalışmalardan biridir. Bu çalışmaya; yaklaşık 300 mide kanserli olgu dahil edilmiştir. DNA sekanslama, RNA sekanslama ve protein dizileme dahil olmak üzere farklı moleküler platformlarda yapılan analizlere göre “mide kanseri patogeneğinde” rol oynayan moleküler mekanizmalar yeni karakterizasyon kriterlerine göre sınıflandırılmıştır. Buna göre mide kanseri kromozomal instabilite (CIN), mikrosatellit instabilite (MSI), stabil genom (GS) ve Epstein-Barr virüs (EBV) olmak üzere 4 genomik alt tipe ayrılmıştır (63,64).

2.7.1. Genomik İnstabilite

Genom kararsızlığı olarak adlandırılan bu değişim mide kanserinin tüm histolojik alt tiplerinde görülebilen kanser başlangıç aşaması adımlarından biridir. Mide kanserinde 3 tip genom instabilitesi saptanmıştır (65).

- 1- Mikrosatellit instabilite (MSI) (DNA tamir mekanizma hasarı)
- 2- Kromozomal instabilite (CIN) (Hücre bölünmesi sırasında genetik materyalin dağılımını kontrol eden genlerde mutasyon meydana gelmesi nedeniyle romozomun tamamı veya bir parçasında oluşan parça kaybı veya parça eklenmesi)
- 3- Guanin-sitozin adacıklarında metilasyon fenotipi (CIMP)

Genomik kararsızlık mide kanseri gelişiminde başlangıç basamaklarından olup, aynı şekilde 5mm’den daha az intramukozal mide kanserinde DNA anöploidileri; kanser prekürsör lezyonlarında gen kopya sayısı değişiklikleri; intestinal metaplazi, gastrik adenom ve erken mide kanserinde ise mikrosatellit instabilite görülmektedir (65).

2.7.1.1. Mikrosatellit instabilite (MSI) alt tipi

Mikrosatellit instabilite, DNA yanlış eşleşme tamirindeki defektler nedeniyle meydana gelen basit tekrarlı mikrosatellit sekansların varlığı olarak tanımlanır. MSI; yüksek oranda (MSI-H), düşük oranda (MSI-L) ve stabil (MSS) olmak üzere 3 gruba ayrılır. MSI karsinogeneizde gözlenen en erken aşamalardandır ve genomik instabiliteye yol açar. Mide tümörlerinin %13-44'ünde görülür (66). Mide kanseri olgularının %10-16'sında özellikle MSI-H alt tipine rastlanır. MSI, antral tümöral lokalizasyon, intestinal tip diferansiyasyon ve daha iyi prognoz ile ilişkilidir. Bu özellikteki mide kanserleri TGF reseptör II mutasyonuna sahip iken, p53 mutasyonu göstermezler (67). MSI-H pozitif mide kanserleri klinik açıdan farklı özellikler gösterdiklerinden dolayı MSI analizleri ile kanser alt tiplerini belirlemek oldukça önemlidir. MSI'nin tarama amaçlı tespiti, kanserin erken tanısı açısından umut vadetmektedir (68).

MSI, daha sık olarak mide kanserli kadın hastalarda saptanan genomik instabilite spektrumunun ana fenotipidir. TCGA çalışmalarına göre MSI alt tipi tüm mide kanseri olgularının %21'ini kapsar. MSI olguları, aynı zamanda diğer kanserlerde gözlenen hot spot mutasyonlara ek olarak sık gözlenen PIK3CA, ERBB3, ERBB2 ve EGFR mutasyonları ile karakterizedir. Mide kanserinde gözlenen MSI'nın temel nedeni DNA yanlış eşleşme tamir geni olan MLH1 geni promoterinde meydana gelen hipermetilasyondur. Saptanan MSI derecesine göre tümörler MSI-H ve MSI-L olmak üzere 2 gruba ayrılır. Herhangi bir mikrosatellit lokusunda instabilite saptanmayanlar ise mikrosatellit stabil (MSS) olarak adlandırılır. MSI-H fenotipine intestinal tip adenokarsinomlarda sık rastlanır ve daha iyi prognozludur (69).

MSI'nın ayrıca, hücre döngüsünü kontrol eden (TGFB2, EPHB2, E2F4), DNA tamirinde görev alan (MRE1, ATR) ve apoptoz sürecinde yer alan (BAX) genlerdeki değişikliklerde rol oynadığı düşünülmektedir (69).

DNA hasar onarım proteinlerinden MLH, MSH2, MSH6 ve PMS2 proteinlerinden birinde meydana gelen inaktivasyon olması durumunda DNA replikasyon sürecindeki hatalar giderilemez, DNA'da normalde bulunmayan alleller meydana gelir ve MSI fenotipi oluşur. MSI çok sayıda geni etkileyen “çerçeve kayması mutasyonları” gibi büyük çaplı genetik değişimlere neden olur (70).

Mide kanserinde sık görülen MSI frekansının araştırılan gen lokusuna bağlı olmakla birlikte %15-38 olduğu bildirilmiştir. Distal yerleşimli, intestinal tip kanserler, ileri yaş

ve kadın cinsiyet mikrosatellit instabilite görülme sıklığı bakımından daha yüksek risklidir. Çoğu mide kanseri vakasında görülen MSI, “MLH1 geni promoteri hipermetilasyonu” kaynaklıdır (71).

2.7.1.2. Kromozomal instabilite (CIN) alt tipi

Mide kanserlerinin %50’si CIN sınıfında değerlendirilir. CIN’lerin %71’i TP53 mutasyonu ile birliktelik gösterir. Ayrıca bu sınıfta ARID1A, KRAS, PIK3CA, RNF43, ERBB2 ve APC gen mutasyonları da gözlenir. P53 geninde ekspresyon artışı TP53 mutasyonu frekansı ve anöploidi ile uyumludur (72). Bu bulgular, APC (%36) ve TP53 (%33) genlerinde gözlenen heterozigote kaybı ile benzer sıklıkta izlenmektedir. TP53 değişimlerinin midedeki “prekanseroz lezyonlarla uyumlu olması” nedeniyle, p53 fonksiyon kaybı mide karsinogenezinin erken dönem bulgusu olabilir.

Bu alt tipte rastlanan EGFR amplifikasyonu ile uyumlu olarak, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) fosforilasyonu da CIN alt tipinde sık gözlenen bir değişimdir (72,73).

CIN alt tipinde sık gözlenen diğer bir önemli bulgu ise, anormal hücre büyümesini indüklenmesine yol açan tirozin kinaz reseptör ailesi (RTK) proteinlerini kodlayan genlerin amplifikasyonudur. CIN alt tipinde görülen diğer genomik değişimler, CCNE1, CCND1, CDK6 gibi hücre döngüsünde yer alan genlerin ekspresyonlarında amplifikasyondur. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri gibi terapötik ajanlar bu anormallikleri hedef alır (74).

“Kromozomal instabilite” (CIN), bir kromozomun tamamında veya bir parçasında kayıp veya duplikasyon riskinin artmış olması olarak tanımlanır. Bu durum onkogenik aktivasyona veya tümör supressör genlerde inaktivasyona yol açabilir. CIN dinamik bir süreç olmakla birlikte, nükleer DNA içeriği gibi statik belirteçlerdeki değişimlerin; DNA sitometrik, “karşılaştırmalı genom hibridizasyonu” (CGH) ile, “gen kopya sayısı değişikliklerinin” ise “floresans in situ hibridizasyon”(FISH) metodu ile saptanması veya “heterozigote kaybı” (LOH) çalışmaları ile belirlenebilir (74).

Mide kanserli olguların %27-100’ünde DNA anöploidileri saptandığını gösteren çalışmalar mevcuttur. DNA ploidi durumu ile klinik-patolojik değişkenler (invazyon derinliği, “lenf nodu tutulumu”, “histolojik alt tip” gibi) ve sağkalım oranları arasındaki ilişkiye dair tartışmalı sonuçlar elde edilmiştir (75).

Tüm genom CGH dizileme çalışmalarında; gen kopya sayısı değişikliklerinde tekrarlı ve karmaşık motifler saptanmış olup, histolojik alt tipler, lenf nodları tutulumu, tümör yerleşimi, yaş, etnisite ve sağkalım ile ilişkili bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda, CGH yöntemi kullanılarak “mide kanseri gelişiminde rol oynayan” ve hastalık prognozunun öngörülmesinde kullanılabilecek aday genler tespit edilmeye çalışılmıştır. CGH metodu; DNA kopya sayısı anormalliklerinin belirlenmesinde faydalı olup; dengeli yapısal değişiklikleri, translokasyon, inversiyon, insersiyon gibi anomalileri ve kromozomal birleşmeleri (füzyonlar) saptayamaz (76).

LOH; kromozomal kararsızlık belirteci olup, spesifik kromozom bölgelerindeki varlığı tümör supressör genlerin tanınmasını kolaylaştırır. Yapılan çalışmalarda; 6q, 8p, 16q, 22q gibi kromozom bölgelerindeki LOH derecesinin “hastalık prognozu” ile ilişkili olduğu bulunmuştur (76).

2.7.1.3. CpG Adacıkları Metilatör Fenotipi

CpG-zengin bölgelerin anormal metilasyonu; kanserde bazı genlerin ekspresyonunun susturulmasında yer alan önemli mekanizmalardan biridir. *H. pylori* ve EBV enfeksiyonu gibi kronik inflamatuvar durumlarda, hastaların normal mukozalarında CpG adacık metilasyonu saptanmıştır. Bu durum mide kanserine ilerlemede öncü değişikliklerden biri olarak kabul edilir (76).

Tümör supressör genlerin metillenerek inaktive edilmesi; kontrolsüz hücre büyümesi, damar invazyonu ve metastaza yol açar. Yapılan çalışmalarda mide kanserli olguların %50’sinde birbiri ile ilişkili birçok gende CpG adası metilatör fenotipine (CIMP) rastlanmıştır. CIMP ile klinik ve patolojik bulgular ve prognoz arasındaki ilişkiyi gösteren veriler kısıtlıdır. Proksimal ve diffüz tip mide kanserinde daha sık görüldüğü saptanmıştır (76).

2.7.2. Stabil genom (GS) alt tipi

GS alt tipi, TCGA araştırmalarında yer alan mide kanseri olgularının %20’sini kapsar ve diffüz tip adenokarsinomla ilişkilidir. Sıklıkla genç olgularda gözlenir. Kromozomal instabil alt tipe göre daha az sıklıkta TP53 mutasyonu ve düşük düzeyde anöploidide birliktelik gösterir. Diffüz tip genom stabil adenokarsinomlu hastaların %13-37’sinde CDH geninde, %14-25’inde RHOA geninde “mutasyon varlığı izlenir”. Hücre adezyonunda görev alan proteinleri kodlayan genlerdeki bu değişimlerin mide

karsinogenezindeki rolü oldukça önemlidir (77). “CDH1 germline mutasyonları”, kötü diferansiye fenotipe ve düşük sağkalım oranına sahip olan herediter diffüz tip mide kanseri ile ilişkilidir. Mutant RHOA proteininin diğer hücre içi proteinlerle olan etkileşimi tümör büyümesinin tipik özellikleri olan morfolojik değişikliklere ve hücre migrasyonuna neden olur (77,78).

2.7.3. EBV-pozitif alt tip

Mide kanserli olguların yaklaşık %10’u EBV pozitifdir. Yapılan bir metanalizde EBV ile ilişkili mide kanserlerinde seyrek lenf nodu metastazı ve daha düşük mortalite oranı olduğu Yapılan çalışmalarda, EBV pozitif olgularda, TCGA çalışmalarında yer alan diğer kanserlere göre daha yüksek oranda DNA hipermetilasyonu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca tüm EBV pozitif olgularda CDKN2A (tümör supressör gen) geni promotörü hipermetile durumdadır. Bu genomik değişimlere, JAK2, CD274, PDCD1LG2, ERBB2 amplifikasyonları ve PTEN, SMAD4, CDKN2A, “ARID1A delesyonları” da eşlik eder (79).

Geçmişte mide kanseri genomik değişimlerden bağımsız bir hastalık olarak ele alınmaktaydı. Yapılan çalışmalar sonucunda saptanan genetik değişimlerle birlikte mide kanseri genetik özelliklerine göre 4 alt gruba ayrılmıştır. Genomik değişimler, kanser etyolojisi, cinsiyet, tanı yaşı ve anatomik lokalizasyon gibi klinik özelliklerle ilişkili bulunmuştur. Kanserlin farklı evrelerinde ve alt tiplerinde saptanan genetik anormalliklerin, karsinogenez üzerindeki etki mekanizmalarının ortaya konması yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesinde oldukça önemlidir (80).

2.8. MİDE KANSERİ İLE GENETİK YATKINLIK İLİŞKİSİ

Genetik risk faktörleri mide karsinogenezinde rol oynamaktadır. Gen polimorfizmlerinin çevresel faktörlerin kanser gelişimindeki rolünün düzenleyicisi olduklarını gösteren çalışmalar mevcuttur. “Bireysel genetik yatkınlığın”; mukozal koruma bariyeri, “H. pylori enfeksiyonuna immün yanıt”, karsinojen detoksifikasyonu ve antioksidan kapasite, DNA hasar onarımı ve hücre çoğalması gibi eksiklikleri halinde kanser gelişiminde predispozan süreçlerde kritik rolü vardır (81).

İlk olarak 2000 yılında El Omar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; IL-1B-31T (rs1143627) ve IL-1 reseptör antagonisti IL1RN*2/*2 genotiplerinin, kronik hipoklorhidri ve mide kanseri gelişimi riskinde artış ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu önemli tespit üzerine; gen polimorfizmleri ile kanseri ilişkisini araştıran çalışmalar hız kazanmıştır. Bununla birlikte; çalışmaların sonuçları arasında uyumsuzluklar vardır. Bu uyumsuzluklar çalışmaya dahil edilen etnik gruplardaki gözlenen genetik farklılıklara, metod değişkenlerindeki varyasyonlara bağlı olabilir (82,83). Küçük hasta gruplarının dahil edildiği çalışmalara ait sonuçların bilimsel kanıt değeri geniş hasta serilerinde doğrulanmalıdır. Verilerin istatistik gücünü ve güvenilirliğini desteklemek amacıyla, farklı çalışmalardan bağlantılı gruplar oluşturularak meta-analizler yapılmalıdır. (83,84,85)

Son yıllarda mide kanseri riskiyle ilişkilendirilebilecek “genetik varyasyonları” ele alan çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Örneğin; H. pylori’nin neden olduğu kronik inflamasyon zemininde gelişen mide kanseri patogenezi basamaklarında yer alan genetik değişimler detaylı biçimde incelenmiştir (84,85). H. pylori enfeksiyonuna karşı doğal immünite uyarılır ve immün hücrelerin yüzeyinde ve GIS epitel hücrelerinin sitosolünde yer alan ve yabancı patternleri tanıyan CARD15/NOD2, CARD4/NOD1, CD14 VE TLR gibi reseptörlerin (PRR) kompleks sinyal mekanizmalarını harekete geçirerek bakteriyel komponentlere (liposakkarid, peptidoglikan, lipoprotein, bakteriyal DNA gibi) cevap verir. Bu genlerde meydana gelen değişimler, H. pylori cevabını etkileyerek NF-KB yolunun anormal aktivasyonuna ve proinflamatuvar molekülleri kodlayan genlerin

upregülasyonuna neden olabilir. Hold ve arkadaşlarının çalışmasında, TLR4+894A>G polimorfizminin “TLR4 ekstraselüler domainini” etkileyerek nonkardiya yerleşimli mide kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir. Yapılan 2 farklı meta-analiz sonuçlarına göre, TLR4+896 G alleli ile Batı toplumunda distal mide kanseri gelişimi riski arasında ilişkili bulunmuştur (86).

IL1B, TNF, LTA, IL6, IL1RN, IL10 ve TGFB gibi pro ve antiinflamatuvar özellikli mediatörleri kodlayan genlerin mide kanseri riskinde rol oynadığı düşünülmektedir. Geniş hasta serilerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda IL1B genindeki -31T>C (rs1143627), -511C>T (rs16944), +3954C>T (rs1143634) gibi önemli baz yer değişimlerinin ve IF1RN geni intron 2 de saptanan değişken sayıda 86bp tandem tekrar polimorfizmlerinin (VNTR) “mide kanseri gelişimi riskindeki rolü” incelenmiştir. Başka bir çalışmada, IL1RN2 ve IL1B-511T allelleri ile distal yerleşimli mide kanseri arasında ilişki gösterilmiştir. IL1RN2 alleli bulunan olgularda, asit sekresyonunu inhibe eden potent bir proinflamatuvar sitokin olan IL-1’in serum düzeyleri yüksek bulunmuştur. Bu olgularda kronik hipoklorhidri, korpus atrofi ve mide kanseri riskinde artış olduğu gösterilmiştir (87,88,89).

IL-1’e benzer şekilde TNF- α ve lenfotoksin (LT) “mide mukozasında inflamatuvar yanıtı” kontrol eden önemli sitokinlerdir. TNF- α mide asit sekresyonu inhibitörüdür.

(26) TNFA geni promoteri -308 ve -238 pozisyonlarında G>A nükleotid değişimleri ve LTA geninin ilk intronunda saptanan NcoI +252 G>A rs909253 ve AspHI +318 G>C rs746868 restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmleri saptanmıştır. Kafkas popülasyonunda yapılan çalışmalarda, TNFA -308 A alleli ile mide kanseri riski arasında ilişki gösterilmiştir. Çin popülasyonunda aynı allel üzerinde yapılan başka bir çalışmada da benzer ilişki tespit edilmiştir (89).

Asya popülasyonunda yapılan başka bir çalışmada, LTA rs909253 G>A polimorfizmi saptanan H. pylori ile enfekte hastalarda mide kanseri riskinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (90,91).

IL-6, inflamatuvar süreçte yer alan bir sitokindir. Mide kanseri hatlarında sentezlendiği ve mide kanserli olguların serum ve tümör dokularında yüksek düzeyde oldukları gösterilmiştir. Buna karşılık, IL-6 geni promoter bölgesinde saptanan 3 farklı tek nükleotid polimorfizmleri (-174 G>C rs1800795, -572 G>C rs1800796, -597 G>A rs1800797) ile mide kanseri riski arasında bir ilişki gösterilememiştir (92,93).

IL-10 sitokininde gözlenen -1082 G>A, -819 C>T, - 592 C>A gen polimorfizmleri ile mide kanseri arasında bir ilişki bulunamamıştır (93,94).

TGFB1 geninde rastlanan polimorfizmlerin TGF-1 “expresyon düzeyini etkilediği gösterilmiştir”. TGFB1 genine ait -509 C>T, +869 T>C ve +915 G>C SNP’leri ile mide kanseri riski arasında bir ilişki gösterilememiştir (95,96).

Sonuç olarak; gen varyantları ile kanser riski alanındaki çalışmaların sonuçları arasında uyumsuzluklar mevcuttur. Olguların kanserin özelliklerini temsil etme gücü, çalışma grupları arasındaki heterojenite gibi faktörler çalışma sonuçlarını etkilemektedir.

2.9. MİDE KANSERİ RİSKİ İLE İLİŞKİLİ TEK GEN POLİMORFİZMLERİ

2.9.1. İmmün yanıt ilişkili genler

İmmün yanıtta görev alan genlerin büyük çoğunluğu interlökin genleri, HLA genleri, TNF genleridir. Son yıllarda interlökin genleri üzerine araştırmalar yapılmıştır. Örneğin; IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-10 genlerinin birçok lokusunda saptanan polimorfizmlerin mide kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir. IL-1 enfeksiyona cevapta immün yanıtı güçlendiren önemli bir sitokindir. Ayrıca mide asit sekresyonunun etkili bir inhibitörüdür (97). 2q13 kromozomunda yer alan IL-1 geni; IL-1 α , IL-1 β ve IL-1RN (IL-1 reseptör antagonistini kodlar) gen bölgelerini içermektedir. Bir vaka-kontrol çalışmasında IL-1RN 2R allelini taşıyanlarda kanser gelişme riski yüksek bulunmuştur (98).

IL-6 temel olarak mononükleer makrofajlarda, endotelial hücrelerde ve lenfoid hücrelerde üretilir. Mide kanseri gelişimde ve ilerlemesinde önemli rolü vardır. Yapılan bir çalışmada, Çin popülasyonunda IL-6- 6331 taşıyıcılarında mide kanseri riskinde artış olduğu saptanmıştır. Bir meta-analiz çalışmasında ise IL-6-174 C/G veya IL-6-572 C/G varlığı ile mide kanseri riskinde artış arasında ilişki gösterilememiştir (99,100).

IL-10; antiinflamatuvar ve tümör gelişimi engelleyici etkiye sahip bir sitokindir. Xue ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Asya’lılarda IL-10-592 AA ve IL-10- 819 TT genotipleri varlığının mide kanseri gelişimine karşı koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir (100).

H. pylori ile enfekte kişilerde, IL-10- 819 C alleli ile IL-10- 592 C allelerinin mide kanseri riskini arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, IL-10 polimorfizmi ile H. pylori varlığının sinerjistik etki gösterdiği bildirilmiştir (101,102).

TNF'ler özellikle anti tümör immünitede görev yapan çeşitli biyolojik aktivitelere sahip sitokinlerdir. Hong ve arkadaşları; Çin popülasyonunda TNF- α - 308 G>A polimorfizmi ile mide kanseri gelişimi arasında ilişki saptamışlardır. HLA antijenleri spesifik T hücre reseptörleri ile etkileşen hücre yüzey proteinleridir. İki grup HLA antijeni vardır; HLA1 (HLA-A) ve HLA2 (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP). Ando ve arkadaşları, H. pylori ile enfekte Japon hasta popülasyonunda yaptıkları çalışmalarında, sınıf 2 HLA ve IL-10- 592 A/C polimorfizminin mide kanseri gelişiminde sinerjistik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (103,104,105).

2.9.2. Mide mukozası koruyucu genleri

Mide mukozası üzerinde koruyucu etkiye sahip majör genler; müsin genleridir. Bilinen alt tipleri; MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6 ve trefoil peptid ailesi genleridir. MUC1 yüksek moleküler ağırlıklı transmembran bir glikoproteindir. Bikarbonat ile birlikte mukus – Zbikarbonat bariyerini oluşturarak mide mukozasını korur. Liu ve arkadaşları meta-analiz çalışmalarında; MUC1 geni rs4072037 bölgesinde bulunan G allelinin mide kanserine karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir (106,107,108).

Trefoil peptid ailesi, meme kanseri ilişkili pS2 peptidi, trefoil faktör ailesi (TFF1), spazmolitik polipeptid (SP) ve intestinal trefoil faktörü (ITF) içeren bir gen ailesidir (109).

Trefoil peptidlerin; mukus yapısı içinde müsinlerle etkileşerek gastrointestinal mukozadaki koruma bariyeri kapasitesini arttırdığı, epitelyal göçü indüklediği, normal ve prekanseröz lezyonların farklılaşmasını desteklediği ve tümör hücre büyümesini çoğalttığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda TFF2 gen polimorfizmlerinin mide kanseri ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir (110,111).

2.9.3. Metabolik enzim genleri

Faz I metabolizma enzimlerini kodlayan P450 enzim (CYP450) sistemine ait genlerin mide kanseri gelişimi ile ilişkili oldukları gösterilmiştir. Bu sistem; hücre içi biyolojik makromoleküllere saldırarak DNA üzerinde karsinogenez ve mutagenез süreçlerini aktifleyen prokarsinojenlerin elektrofilik bileşenlere metabolize edilmesini katalizleyen enzimleri içerir. Yapılan çalışmalarda 7 adet CYP geninde (CYP1A1, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6 ve CYP2E1) genetik polimorfizm tespit edilmiştir.

Bunlardan; CYP1A1, CYP2E1 ve CYP2C19 mide kanseri yatkınlığında rol oynayan majör genlerdir. Glutasyon S-Transferazlar (GST'ler) faz 2 metabolik enzimlerle ilişkilidir. Bu enzimler eksojen bileşiklerin ara metabolik ürünleri ile redükte glutasyon arasındaki etkileşiminde katalizör olarak görev yaparlar. Sonuç olarak, redükte glutasyon konjugatları daha az toksik olduklarından vücuttan daha kolay atılırlar. Bu enzimler, hücrelerin kimyasal ve karsinojen etkili saldırılardan korunmasında önemli rol oynar (112,113).

2.9.4. Diğer antioksidan ve detoksifikasyon enzimleri kodlayan genlerde saptanan tek nükleotid polimorfizmleri

Çin popülasyonunda yapılan bir meta-analiz çalışmasında, CYP1A1 Ile/Val genetik polimorfizminin sindirim sistemi kanserleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, CYP1A1 geni Ile462Val polimorfizmi ile mide kanseri arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bu nedenle, etnik farklılıkları gözetten geniş örneklem boyutunda, iyi dizayn edilmiş kapsamlı çalışmaların yapılması bu ilişkinin aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır (114).

Lao ve arkadaşlarının çalışmasında, GSTM1 null genotipinin mide kanseri gelişiminde önemli bir genetik risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Fakat Güney Avrupa popülasyonunda GST polimorfizmi ile bireysel kanser yatkınlığı arasında ilişki bulunamamıştır (115).

Yapılan çalışmalarda siklooksijenaz 2 (COX-2), 12-lipoksijenaz (LOX12) ve süperoksit dismutaz (SOD) genlerinde gözlenen polimorfizmlerin mide kanseri gelişiminde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (116,117).

2.9.5. DNA tamir genleri

DNA hasarı ve onarım süreçleri mide kanseri gelişiminde önemli rol oynar. DNA tamir genleri DNA stabilitesinin korunmasında oldukça önemlidir. Eğer DNA hasarı tam ve eksiksiz onarılabılırsa, vücut metabolizma süreçleri doğru şekilde işlev görür. DNA tamir genlerindeki anormallik nedeniyle fonksiyonları olumsuz etkilediğinde, DNA hata tamiri yapılamaz. Sonuç olarak DNA hasarı, hatalı protein ekspresyonuna ve daha ileri dönemde tümör gelişimine neden olur. Ana DNA tamir genleri; metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), X-ışını hasarı çapraz komplementi 1 (XRCC1) ve insan 8-oksoguanin glikozilaz 1 homoloğu (HOGG1)'dir (118).

2.9.6. Deoksinükleotid sentezi genleri

MTHFR; folat ve metionin metabolizmasında hız kısıtlayıcı enzim olarak görev yapar. MTHFR gen polimorfizmi metil gruplarında bozukluğa neden olarak folat metabolizmasını etkiler ve mide kanseri gelişimini kolaylaştırır. Bir meta-analiz çalışmasında, TT genotipine neden olan MTHFR C677T polimorfizminin mide kanseri yatkınlığını arttırdığı, A1298C SNP'inin ise etkisiz olduğu saptanmıştır (119).

XRCC1 genine ait polimorfizmler ile kanser ilişkini araştıran çalışmalar başlangıç aşamasındadır ve hala çalışmalar arası uyumsuz sonuçlar tespit edilmektedir. Yakın zamanda, XRCC1 geninde 3 “polimorfik lokus” bulunmuştur. Bunlar; ekson 6'da C26304T (Arg194Trp); ekson 9'da G27466A (Arg280His) ve ekson 10'da G28152A (Arg399Gln)'dır (119).

Pan ve arkadaşlarının Çin popülasyonunda yaptıkları çalışmada, XRCC1 geninde saptanan Arg399Gln polimorfizmi ile “non kardiya yerleşimli mide kanseri” gelişimi riskinde artış saptanmıştır (120).

Han ve arkadaşlarının çalışmasında, HOGG1 genine ait 3 allel (Ser326, Cys326, Gln46) ile DNA'nın kimyasallarla indüklenen mutagenезinde önleyici etkilere sahip oldukları gösterilmiştir (121).

2.9.7. Tümör supressör genler

P53 geni önemli bir tümör supressör gendir. Malakar ve arkadaşlarının çalışmasında; bu genin Arg/Arg allelinin, özellikle diffüz tip olmak üzere artmış mide kanseri riski ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (122).

Yapılan bir meta-analiz çalışması sonuçlarına göre; p53CD72 polimorfizmi mide kanseri riski ile bağlantılı bulunmuştur. Asya popülasyonunda biyomarker olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (123).

NM23, ilk doğrulanan tümör metastaz önleyici gendir. Nükleozid difosfat kinaz ailesinden bir protein kodlar. Bu proteinin ekspresyonu tümör invazyonu ve metastazı ve kötü prognoz ile doğrudan ilişkilidir. Son yapılan çalışmalarda; NM23 gen ekspresyonu ile mide kanseri gelişim mekanizmaları arasında ilişki bulunmuştur (124,125).

2.9.8. Mide kanserine yatkınlık oluşturan diğer genler

Son yıllarda mide kanserine yatkınlıkla ilişkili birçok gen bulunmuştur. Örneğin, bir büyüme faktörü olarak transforming growth factor (TGF- β) ile farklı tümörlerin gelişimi ve ilerlemesi arasında ilişki saptanmıştır. Yapılan meta-analizlerde TGF- β 1 509T gen varyantının mide kanseri gelişiminde predispozan olduğu gösterilmiştir (126).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) 32-34 kDa ağırlığında multifonksiyona sahip bir glikoproteindir. VEGF’i kodlayan gen 6.kromozomun uzun kolunda (6p21.3) yerleşmiştir. Yapılan çalışmalarda, VEGFA-634G/C ile mide kanseri gelişimi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (127,128).

Adiponektin, vücudun enerji dengesinin sağlanması ve insülin duyarlılığının artırılmasında görev alan antiinflamatuvar ve antiaterojenik etkili protein yapıda bir hormondur. Bir çalışmada, adiponektin düzeyi mide kanserli hastalarda normal popülasyona oranla daha düşük düzeyde bulunmuştur. Ye ve arkadaşlarının çalışmasında, ADIPOQ gen polimorfizmi ile mide kanseri arasında ilişki olabileceği öne sürülmüştür (129).

2.10. KANSERE YATKINLIKTA BİYOBELİRTEÇ ADAYI GEN VARYANTLARININ İNCELENMESİ

Aday genin yapısındaki fonksiyonel değişimler, o genin kodladığı proteinin fonksiyonunu ve miktarını doğrudan etkilemektedir. Bu genlerin hastalık patofizyolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir. Günümüzde hala aday genleri inceleyen birçok çalışma yürütülmektedir. İnflatuvar yanıtla ilişkili genlerdeki SNP’ler çalışma konuları arasındadır (130).

Araştırmacılar, inflamatuvar süreçlerde rol oynayan genlerdeki SNP’ler ile mide kanseri arasındaki ilişki olduğunu göstermişlerdir. Mide kanserinde en çok çalışılan “inflamatuvar yanıt ile ilişkili genler”, interleokin genleri olan IL1B, IL1RN, IL8, IL10, IL17 ve TNF- α olup, bu genler sırasıyla IL-1b, IL-1ra, IL-8, IL-10, IL-17 ve TNF- α proteinlerini kodlamaktadırlar. Bu sitokinler mide fizyoloji ve patofizyolojisinde yer alan önemli mediatörlerdir ve yapılan çalışmalarda mide kanseri etyolojisinde rol oynadıkları öne sürülmektedir. El Omar ve arkadaşlarının çalışmasında, IL-1 gen ailesi polimorfizminin, H. pylori ile ilişkili hipoklorhidri ve mide kanseri gelişimi riskinde artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir (130,131). Kafkas ırklarında yapılan çalışmaların çoğunda, IL1B-511

polimorfizminin T allelinin non- kardiya yerleşimli mide kanseri olgularında (çoğunlukla intestinal alt tip) sık rastlandığı tespit edilmiştir (132,133).

Son yıllarda, CDH1 geni promoterindeki SNP'nin, genin transkripsiyonel aktivitesini etkileyerek E-katherin ekspresyonunu değiştirdiği gösterilmiştir. En sık çalışılan SNP, CDH1 C-160A'dır (134,135). Literatürde A allelinin CDH1 geni transkripsiyonunu azaltarak, bazı popülasyonlarda mide kanseri gelişimi riskini arttırdığını bildiren çalışmalar vardır. Fakat son yıllarda yapılan bir meta-analiz çalışmasında, CDH1 C-160A polimorfizmi ile mide kanseri yatkınlığı arasındaki ilişki doğrulanamamıştır (136).

SNP'ler, farklı etnik popülasyonlarda değişken sıklıkta rastlanan genetik varyasyonlardır. Belirli SNP'ler gen ekspresyon profilini ve gen fonksiyonunu etkileyerek kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara yatkınlığa neden olabilir. Mide kanseri riskini arttıran çok sayıda polimorfik gen bulunmuştur. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) araştırmalarında, direkt sekanslama, “restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi” (RFLP) analizleri ve hibridizasyon için RNAase ya da oligonükleotid spesifik allelleri kullanan chemical cleavage of mismatch (CCM) yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Bu metodların duyarlılık sınırları farklıdır ve teknik olarak kompleks ve yüksek maliyetli ekipman ve reaktiflere ihtiyaç vardır (137).

SNP'lerin saptanmasında en yaygın kullanılan metoddaki, PCR uygulamasını takiben restriksiyon enzimleri (PCR-RFLP) ile kesim yapılır. Bu yöntem, nokta mutasyonların, delesyonların ve restriksiyon enzim tanıma bölgeleri oluşturan veya yok eden kısa insersiyonların saptanmasında etkilidir. Metod, restriksiyon enzim kesimi ile farklı moleküler ağırlık ve uzunlukta olacak şekilde ayrılan DNA fragmanlarının saptanması prensibine dayanır. Restriksiyon fragmanlarındaki polimorfizmlerin analiziyle mutasyon varlığı/yokluğu saptanarak bireyin genotipinin belirlenmiş olur (137).

Moleküler alanda gelişen teknoloji ile birlikte genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) yapılmaya başlanmıştır. GWAS ile yüksek çıktılı genetik analizler yapılarak daha önce saptanmamış SNP'ler ile hastalık arasındaki ilişki incelenebilmektedir. Bu yeni yaklaşımda, birçok SNP aynı anda analiz edilebilmektedir. Gen varyantlarının görülme sıklıkları; etnik ve çevresel farklılıklara göre değişkenlik göstermektedir (138).

Son zamanlarda, kompleks hastalıklar ile ilişkili gen varyantlarının saptanmasına ve hastalık riski, tanı, erken tedavi ve prognozda öngördürücü biyomarkerların geliştirilmesine yönelik genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) yapılmaktadır.

GWAS araştırmalarında mide kanseri riski ile ilişkili farklı gen varyantları saptanmıştır. Genetik penetransın dūřuk olduğu varsayılan patolojilerde hastalık etyolojisi ve progresyonu, SNP dışı birçok faktörden etkilenmektedir. Multifaktöryel kompleksite, genetik marker çalışmalarını interfere eder (139).

Mide kanseri, multigenik orijinli heterojen bir hastalıktır. Hastalık belirteci olabilecek aday gen çalışmalarında ve GWAS araştırmalarında, mide kanseri patogenezinin heterojen doğası gereği istatistiksel kısıtlılıklar mevcuttur. Örneğin; aday gen çalışmalarında yüksek oranda yalancı pozitiflik ve hatalı etki büyüklüğu vardır. GWAS yaklaşımında ise çoklu testler nedeniyle yalancı negatiflik oranı yüksektir. Mide kanseri riskinin belirlenmesi amacıyla yapılacak olan “aday gen çalışmalarında” uygun analitik metod ve istatistik değerlendirmenin seçilmesi hastalık riskiyle ilişkili inflamasyon veya metabolizma süreçlerinde aktif olan gen lokuslarının ve kanserli olgularda meydana gelen genomik değişimlerin saptanmasında oldukça önemlidir. Hastalık predizpozanı olabilecek genetik değişikliklerin ve mide karsinogenezinde yer alan diğer moleküler mekanizmaların aydınlatılması yeni tanı, tedavi ve takip stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (140).

Genom boyu ilişkilendirme çalışmalarında (GWAS) 200’den fazla yeni dūřuk penetranslı kansere yatkınlık lokusları tespit edilmiştir. İncelenen her lokusla ilişkilendirilen kanser riski ılımlı bulunmuştur ve gen varyantlarının fonksiyonel etkilerinin hastalık yatkınlığına neden olabileceği gösterilmiştir. Post-GWAS araştırma alanındaki en zor aşama, bu lokus ilişkilerinin fonksiyonel sonuçlarının ortaya çıkarılmasıdır. Bu aşamadan elde edilen sonuçlarla hastalık tarama ve önlemede etkin stratejiler ve güvenilir biyomarkerlar geliştirilebilir (141).

Post-GWAS alışmalar, kanser riski ile ilişkili lokusun genetik epidemiyolojik ayırımı, fonksiyonelliğin biyoinformatik analizi ve risk ile ilişkili varyantlar ile hedef genlerinin etkileşimlerine ait muhtemel “moleküler mekanizmaların” in vivo-in vitro deneysel çalışmalarla verifikasyonu şeklinde ele alınmalıdır. Epidemiyolojik çalışmalarda geniş hasta popölasyonlarında yoğun SNP analizleri yapılması önerilmektedir. Öncelikle en nadir rastlanan gen varyantının etkileri analiz edilmeli, daha sonra sıklıkla birliktelik gösteren genetik varyantlar irdelenmelidir. Sık görülen genetik varyantlar mide kanseri gelişimindeki kalıtsal riski tümüyle açıklamaz. Açıklanamayan riske karşılık gelenler dūřuk penetranslı nadir görülen genetik

varyantlardır. Bu varyantlar düşük frekanslı (allel frekansı $<0,05$), subpolimorfik varyantlar (allel frekansı $0,01-0,1$) ya da çok düşük frekanslı ($<0,01$) genetik varyantlar olabilirler. Mide kanserinde görülen nadir varyantlarla ilgili az sayıda çalışma mevcuttur (142).

Günümüzde yapılan çalışmaların çoğu ekzom analizine dayanmaktadır. Tüm genom sekanslama tekniğinin maliyet açısından elverişli hale gelmesiyle birlikte nadir gözlenen varyantların analizindeki kısıtlılıkları ortadan kaldıracak düşünülmektedir. Bununla birlikte ekzom dışı varyantların fonksiyonel analizlerinden elde edilecek sonuçların, genom çapında sekanslama temelli bağıntı analizlerini kolaylaştıracağı öngörülmektedir (142).

2.11. TRAIL SİNYAL YOLAĞI

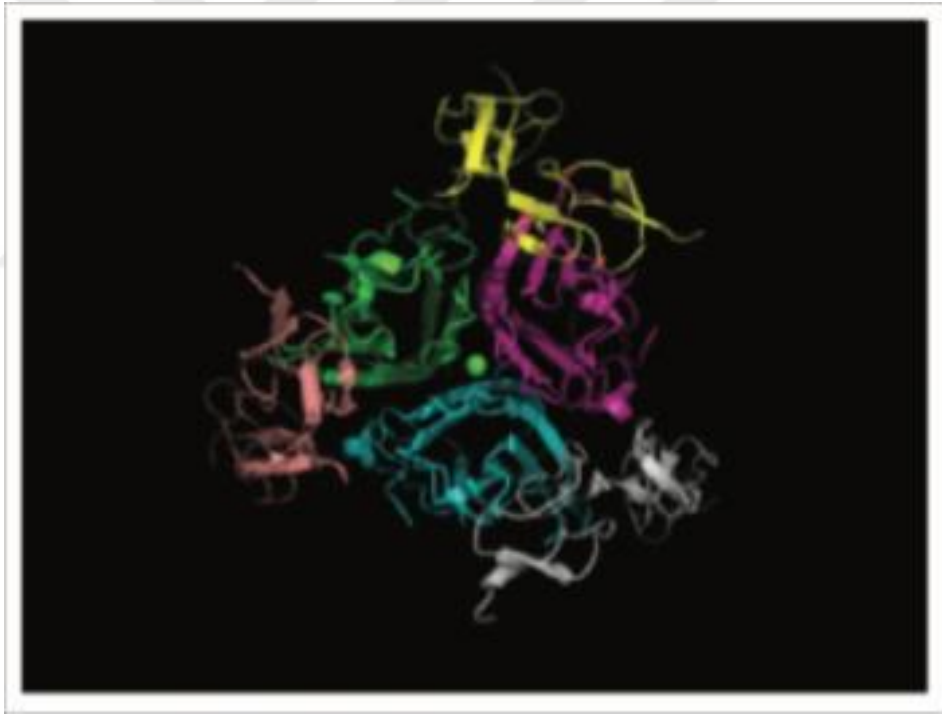
2.11.1. TRAIL yapısı ve reseptörleri

TRAIL geni 3. Kromozomun 3q26 kolu yerleşim gösteren 5 ekzonlu bir gendir. TNF- ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL), tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin diğer proteinleri ile sekans homolojisine sahiptir. Farklı insan kanser hücre hatlarında, tümöre seçicilik gösteren apoptoz indükleyici etkileri olduğu gösterilmiştir. Dalak, timüs, prostat, ince bağırsak ve plasenta gibi birçok fetal ve yetişkin dokuda ifade olmaktadır. TNF ailesinin diğer üyelerinden farklı olarak membrana bağlı olan TRAIL; sitokin stimülasyonunu takiben monositler, B lenfositleri, dendritik hücreler ve doğal öldürücü (NK) hücrelerde ifade edilir. Polimorf nükleer nötrofillerde intraselüler olarak depolanmaktadır (143,144).

TRAIL, kansere özgü apoptotik özelliği olan, 33 kDa molekül ağırlığında, kısa bir N-sitoplazmik domain ve ekstraselüler yerleşimli uzun bir C-terminal bağlanma domaini sahip kristal yapıya sahip bir proteindir. Sisten proteazlar tarafından posttranslasyonel modifikasyona uğrar (Şekil 2.2).

Fizyolojik durumlarda, “proapoptotik ölüm reseptörleri” olan DR-4 (TRAIL-R1) ve DR-5 (TRAIL-R2) ile iki decoy reseptör olan DcR1 (TRAIL-R3) ve DcR2 (TRAIL-R4) olmak üzere 4 farklı transmembran proteine bağlanmaktadır. Ligand bağlanması durumunda TRAIL ve reseptörleri; ikili kompleks halinde homotrimer yapı oluştururlar (145,146). TRAIL, hücre içi domaini olmayan DcR1 ve hücre içi domaini olan DcR2 reseptörleri ile bağlanır. Bu iki decoy reseptör TRAIL için benzer bağlanma

afinitesine sahip ölüm reseptörleri ile yarışır. X ışın kristalografisi ile gösterilen çözünür TRAIL molekülünün trimerik yapısına göre; 3 monomerin arasında yapısal bütünlük ve aktiviteyi sağlayan çinko (Zn) atomu yerleşmiştir. TRAIL'in proapoptotik DR4 ve DR5 reseptörlerine bağlanmasıyla birlikte bu reseptörlerin hücre içi ölüm domainlerinin (DD) kolokalizasyonu gerçekleşir ve hücre ölüm sinyallerini aktiflenir. TRAIL- R1, R2 ve R4, TNF reseptör ailesi üyeleri ile homoloji gösterirler, tip 1 transmembran proteinlerdir. TRAIL-R1 ve R2 sitoplazmik parçalarında apoptoz sinyallerini iletmelerini sağlayan ölüm domainleri (DD) mevcuttur. TRAIL- R4 apoptotik sinyalleri aktaramaz. TRAIL- R3'ün sitoplazmik domain içermez ve glikozil fosfatidilinositol bağıyla hücre yüzeyine tutunur. Apoptotik görevi yoktur. Her reseptörün TRAIL'e bağlanma afinitesi ve gücü farklıdır. TRAIL-R3 en yüksek afiniteye sahip reseptördür (146,147).



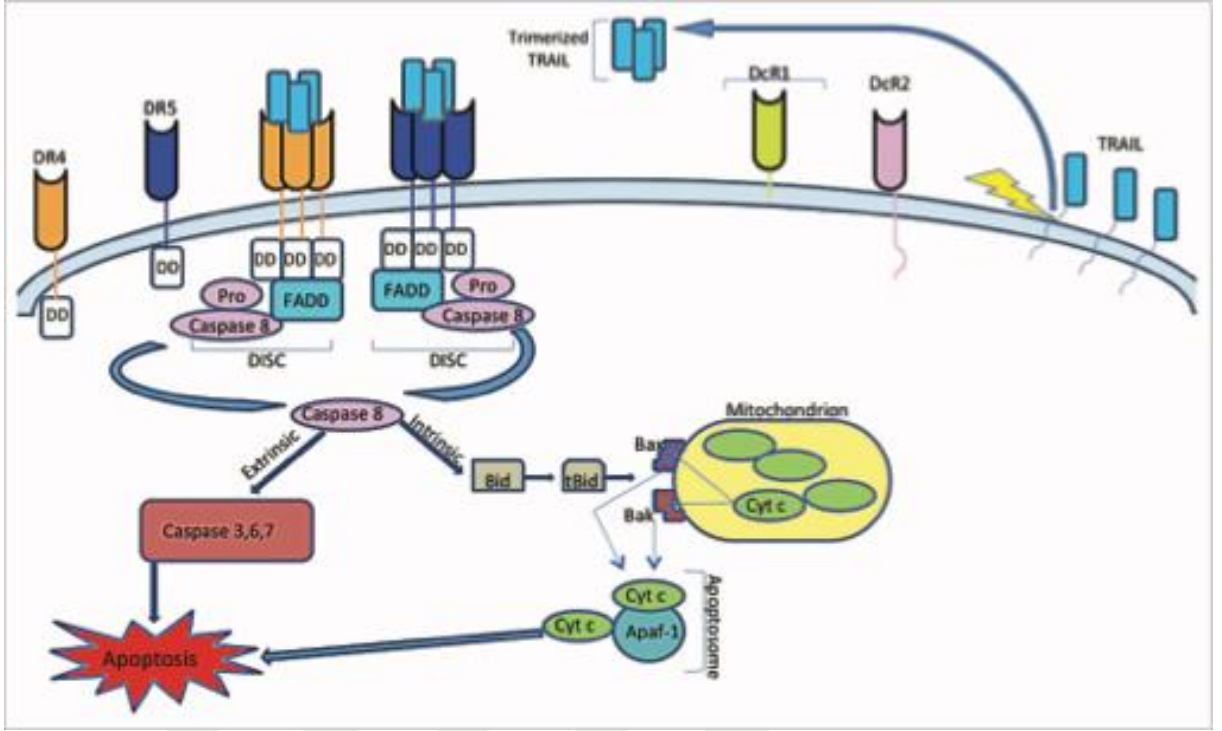
Şekil 2.2: TRAIL-DR4 (TRAIL- R1) kompleksi kristal yapısı (146).

2.11.2. TRAIL sinyal aktarımı

Ekstrinsik apoptoz sinyal yolağı: TRAIL'in DR4 ve DR5'e bağlanması reseptörlerin trimerizasyonuna ve Fas-ilişkili ölüm domaini (FADD) ile birleşmesine yol açar. FADD efektör ölüm domaini yoluyla prokaspaz-8 veya prokaspaz-10 ile birlikte ölüm indükleyici sinyal kompleksini (DISC) oluşturur. Bu sırada öncül-inaktif kaspazlar proteolizle aktiflenir. Aktif kaspaz-8 ve kaspaz-10 downstream efektör kaspaz-3'ü etkinleştirir. Bu bağlanma ile ölüm substratları parçalanır. Kaspaz 8'in aktivasyonu FLICE benzeri inhibitör protein (c-FLIP) tarafından veya ubiquitinasyon yoluyla düzenlenir. C-FLIP, kaspazların FADD ile bağlanmasını yarışmalı olarak inhibe eder (147,148).

İntrinsik apoptoz sinyal yolağı: DISC'te prokaspaz-8 otokatalitik ayrılma ile kaspaz-8'i oluşturur. Bu yolağı kullanarak apoptoza giden hücreler tip 1 hücrelerdir, tip 2 hücrelerde ise kaspaz-8 Bid'i tBid oluşturmak üzere parçalar. Bu protein de Bax ve Bad ile etkileşerek mitokondrial membrandan sitokrom C salınmasını sağlar. Mitokondri membran geçirgenliğinin artmasıyla Smac/DIABLO sitozole salınır. SMAC/DIABLO efektör kaspazların aktivasyonunun sürdürülmesi için X'e bağlı apoptoz inhibitör proteinini (XIAP) inhibe eder (148).

Sitozole salınan sitokrom C, apoptotik peptidaz aktifleyici faktör (Apaf-1) ve prokaspaz-9'a apoptozom oluşturmak üzere bağlanır. Apoptozom oluşumu kaspaz kaskadını aktifler. Kaspaz-9'un aktiflenmesi downstream efektörler olan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi parçalar. Ve bu protein; efektör kaspazların aktivasyonunun sürdürülebilirliği için X'e bağlı apoptoz inhibitör proteinini (XIAP) inhibe eder (149).



Şekil 2.3: TRAIL aracılı apoptotik sinyal mekanizması (149)

2.11.3. TRAIL molekülü fizyolojik görevleri

TRAIL molekülü, TRAIL geni promotor bölgesinde cevap elementi bulunan interferon-gama ve diğer sitokinlerin uyarısı ile immün efektör hücrelerin yüzeyinde exprese edilir. TRAIL knockout farelerde yapılan çalışmalarda; canlıda belirgin gelişimsel defekt oluşmadığı gösterilmiştir. TRAIL- knockout farede ayrıca timosit apoptozu indüklenmez. TRAIL-R knockout farede gelişim normaldir fakat timüs boyutunda büyüme ve bazı dokularda radyasyon ile uyarılmış apoptozda azalma gösterilmiştir (149).

2.11.4. TRAIL gen ekspresyonunun düzenlenmesi

İnsan TRAIL geni apoptotik düzenleme de immün cevaptaki rolü nedeniyle sıkı düzenleme altındadır. TRAIL geni promotor bölgesi 1,6 kB uzunluğunda olup, translasyon başlangıç bölgesinin 97 baz çifti upstreaminde yer alır. TRAIL gen promotor bölgesinde NHF3, GKLf, AP1, CEBP, NFAT, GATA ve interferon-gama ile aktiflenen sekans (GAS), GSP1, GSP2 ve GSP4 gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri için bağlanma alanları bulunur. Caco-2 hücrelerinde luciferaz reporter kullanan TRAIL gen promoterinde meydana gelen sekansiyal delesyonlar, -1371/-819 ve -165/-35 arası

bölgelerin bazal TRAIL gen transkripsiyonunda kritik role sahip elementleri içerdiklerini ortaya koymuştur. TRAIL gen ekspresyonu; bazı sitokinlerin uyarısına cevap olarak, bazı olgularda da gen promoterindeki konsensus bağlayıcı bölgeleri olan transkripsiyon faktörleri ile ilişkili olarak artmaktadır (150).

2.11.5. TRAIL ile ilişkili interferonlar

İnterferonlar; bir uyarana karşı immün cevap oluşturmakla görevli hücrelerin çeşitli mekanizmalarla aktivasyonu ve hareketi süreçlerinde yer alan mediatörlerdir. Luciferaz reporter çalışmalarında; interferon-gama (IFN- γ) -165 ve -35 bölgelerinde TRAIL geni promoter aktivitesini 2 kat arttırdığı gösterilmiştir. STAT1 ve IRF1'in; IFN- γ 'nın TRAIL promoteri üzerindeki etkisine aracılık ettiği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda; IFN- γ 'nın akciğer kanseri hücrelerinde, FasL ve TRAIL bağımlı apoptozu indükleyici etkisi olduğu ve Nk hücrelerinde IL-18 ve TLR3 ile indüklenen TRAIL ekspresyonundan sorumlu olduğu gösterilmiştir (151).

Tip 1 interferonların (IFN- α ve β); TRAIL genini IFN- γ 'dan daha kuvvetli olarak indüklediklerini öne süren çalışmalar mevcuttur. IFN- α ve IFN- β ; CD3 stimülasyonunu takiben, periferik kan CD4⁺ ve CD8⁺ hücrelerindeki TRAIL yolağının potent indükleyicileridirler. IFN- α 'nın makrofaj ve lenfoma hücrelerindeki TRAIL'i JNK bağımlı biçimde; IFN- β 'nın da kolorektal kanser hücre hatlarında TRAIL'i Stat-1 bağımlı mekanizma yoluyla indüklediği gösterilmiştir (150,151).

NFAT: İnsan TRAIL geni transripsiyon faktörü NFAT tarafından pozitif yönde regüle edilir. Bu düzenlenme; T hücrelerinin aktivasyon sürecinde meydana gelen kalsinörün aracılı defosforilasyon yoluyla aktive edilir.

Wang ve arkadaşları, TRAIL promoterinin NFAT bağlama bölgeleri üzerine yaptıkları çalışmalarında; NFAT ailesinden NFATc1'in TRAIL gen transkripsiyonunun en potent pozitif düzenleyicisi olduğunu saptadılar. Bu bulgudan farklı olarak; NFAT bağımlı TRAIL geni pozitif düzenlenmesinin, NFAT'ın TRAIL promoterindeki luciferaz raportör olduğu varsayılan bağlanma bölgelerindeki delesyondan etkilenmediği tespit edilmiştir (151).

Kromatin immünpresipitasyonu ve elektroforetik hareketlilik kayma yöntemleri çalışmalarında NFATc1'in TRAIL genine SP-1 bağlanmasını engellediği gösterilmiştir.

Bu çalışmalar; sitotoksik T hücreleri gibi immün sistem hücrelerinin TRAIL upregülasyonunda alternatif mekanizmalar kullanabildiklerini ve transkripsiyonel düzenlenmenin anlaşılması için bağlanma bölgelerinin direkt olarak araştırılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Çalışmalarda ayrıca, SP-1'in TRAIL gen promoter bölgesinin negatif regülatörü olabileceği öne sürülmüştür (152).

SP-1: TRAIL promoter bölgesinin NFAT aracılı regülasyonunun ortaya konduğu çalışmada, insan intestinal hücrelerinde SP-1'in TRAIL gen transkripsiyonunu baskıladığı saptanmıştır. Bununla birlikte; vasküler düz kas hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada ise Thr453 fosforile SP-1'in TRAIL gen transkripsiyonunu pozitif yönde regüle ettiği gösterilmiştir. Bu etkinin hücre tipi farklılıklarına bağlı olarak gerçekleşme ihtimalinin ve SP-1 aracılı TRAIL geni düzenlenmesinde fosforilasyonun yerinin ortaya konması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (154).

NFκB: Jurkat T hücreleri ve primer T lenfositlerde transkripsiyon faktörü NFκB'nin inhibisyonu üzerine yapılan bir çalışmada, bu faktörün; TRAIL gen ekspresyonu düzenlenmesine NFκB faktör bağlanma bölgesi 1 üzerinden pozitif yönde etkilediği gösterilmiştir. NFκB ayrıca FasL'yi upregüle eder. Bu proapoptotik ligandlar tümör hücresinin immün sistem tarafından ortadan kaldırılmasından ve/veya otoimmünitenin engellenmesi amacıyla T hücre aktivasyonunun zayıflatılmasından sorumludurlar.

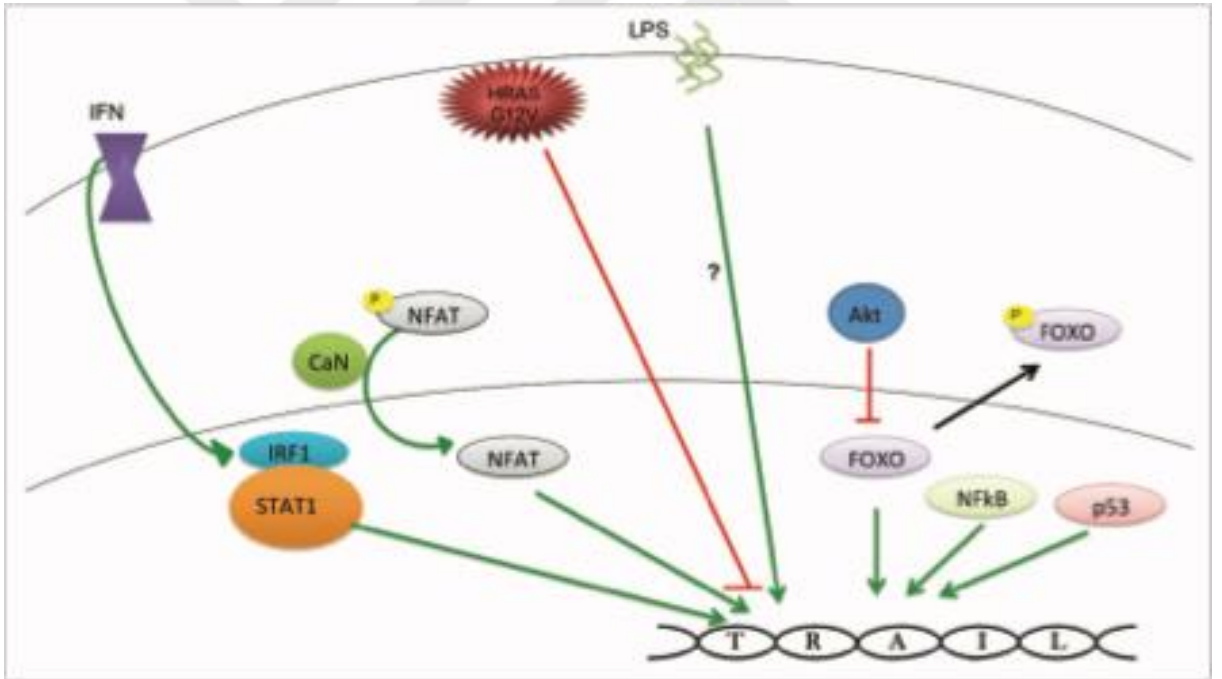
TRAIL gen transkripsiyonu NFκB tarafından pozitif, NFκB'nin NFκB bağlanma bölgesi 1'e bağlanmasını inhibe eden prostaglandin 15d-PGJ2 tarafından ise negatif yönde düzenlenir. Bir transkripsiyon faktörü olan HSF-1; TRAIL gen transkripsiyonunun prostaglandin 15d-PGJ2 tarafından baskılanmasında negatif regülatör olarak görev yapar. Bu negatif düzenlenme HSF-1'in DNA bağlanma domainine bağımlıdır. Kalsinörin'in regülatör alt birimi olan Cnb'nin NFκB aracılı TRAIL ekspresyonunu direkt olarak integrin CD11b'ye bağlanarak aktive ettiği gösterilmiştir (155).

2.11.6. TRAIL ile ilişkili tümör supressör genler ve transkripsiyon faktörleri

P53: 5-florourasil ve doksarubisin gibi p53 indükleyici kemoterapilerin TRAIL promoter aktivitesini arttırdığının tespit edildiği çalışmaları takiben TRAIL gen promoterinde iki adet p53 "potansiyel bağlanma bölgesi" tanımlanmıştır. Luciferaz raportör analizlerinde; -630 pozisyonundaki bağlanma bölgesinin p53 ile indüklenen TRAIL promoter aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir (156).

Yapılan çalışmalarda radyasyonun da TRAIL ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir. İyonizan radyasyonun p53 üzerindeki indükleyici etkisinden dolayı, p53'ün radyasyon ile artan TRAIL ekspresyonundaki rolü de araştırılmalıdır (157).

FOXO: Gen ekspresyon profillemeye çalışmalarında; prostat kanseri hücrelerinde Foxo3a overekspresyonunun TRAIL “gen transkripsiyonunu” arttırdığı gösterilmiştir. In silico analizlerle saptanan TRAIL geni promotörü -121 ve -138 arasındaki bağlanma bölgelerinin; Foxo3a ile indüklenen TRAIL gen promoter aktivitesinden sorumlu oldukları EMSA ve luciferaz raportör analizleri ile ortaya konmuştur (161) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: TRAIL regülasyonunda rol oynayan moleküller (Yeşil ok: Aktivatör, Kırmızı ok: İnhibitör etkili) (161).

Keşfedilmemiş bağlanma bölgeleri: TRAIL gen promotöründe birçok transkripsiyon faktörü için bağlanma bölgesi olarak işlev gören nükleotid dizileri keşfedilmiştir. En iyi bilinen transkripsiyon faktörleri; $\text{NK } \kappa/\beta$, AP-1 ve SP-1'dir. Oct-1, bazı housekeeping

genlerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür ve TRAIL geni promoterında bağlanma bölgesi bulunur. Yapılan çalışmalarda, histon deasetilasyon inhibitörlerinin (HDACi) Oct-1 ile etkileşerek Gadd45 (büyüme durdurucu- DNA hasar onarıcı) ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. TRAIL gen promoter bölgesi ile Oct-1 arasındaki ilişkinin incelenmesi kanser çalışmaları alanında değerli bir araştırma konusu olabilir. Aynı şekilde TRAIL aracılı hücre ölümünde koruyucu rolü olan “ısı şok proteinleri” (HSP’ler) ile TRAIL geni promoter bölgesi arasındaki etkileşim de kanser araştırmalarında yer alabilir (159).

MAPK yolu: HRAS!2\$ ile transforme edilen hücrelerde, TRAIL gen promoterı transkripsiyon başlangıç noktasına 2000 baz çifti uzaklıkta bulunan CpG adacıklarının hipermetilasyona uğramasıyla TRAIL gen ekspresyonu susturulmuştur. Buna rağmen, TRAIL bu transforme hücrelerde IFN- γ tarafından indüklenebilmiştir. Gen susturumu, bir “DNA metiltransferaz inhibitörü” olan desitabin ile geri çevrilebilir (160).

KRAS’ın onkogenik mutasyonu kolon kanseri patogenezinde izlenen genomik bir değişimdir. Onkogenik RAS’ın transforme hücreleri, DR4 ve DR5’in MEK-bağımlı upregülasyonu yoluyla TRAIL aracılı apoptoza duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir. Tümörögenizde sıklıkla gözlenen RAS’ın onkogenik transformasyonu sırasında gelişen TRAIL aracılı apoptozun indüklenmesinin engellenmesi için TRAIL ekspresyonunun eş zamanlı olarak susturulması gereklidir (160).

Diğer indükleyiciler: Son çalışmalarda, pigment epiteli kaynaklı faktör (PEDF)’in makrofaj yüzeyinde TRAIL ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. İleri çalışmalarda PEDF’in, PPAR-cevap elementindeki transkripsiyonu upregüle etmek üzere TRAIL promoterına bağlanan peroksizom proliferatör aktive reseptör gama (PPAR γ)’yı indüklediği tespit edilmiştir. Bu bulgular, immün hücrelerdeki TRAIL ekspresyonunun indüklenme mekanizmasına birer örnek olarak sayılabilir. TRAIL gen ekspresyonunu etkileyen farklı moleküller bulunmuştur fakat altta yatan direkt transkripsiyonel mekanizma henüz aydınlatılamamıştır (161).

2.11.7. TRAIL aktivitesinin izoformlar tarafından düzenlenmesi

İnsan TRAIL geni, 3q26 kromozomunda yer alan yaklaşık 20 kb uzunluğunda bir gendir. Tipik olarak splice akseptör- AG/GT splice donör konsensus bölgeleri içeren 5 ekzon ve 4 introna sahiptir. İlk ekzon 21 aminoasit içeren transmembran domaini ve 17 aminoasit

içeren sitoplazmik domaini kodlar. Ekzon 4 ve 5 TRAIL ve reseptörü ile etkileşen ekstraselüler domain aminoasitlerini kodlar. Ekzon 5 ek olarak, 3'-UTR ve poli-A kuyruğunu içerir ve C-terminal amino asitleri kodlar (162).

TRAIL'in bugüne kadar saptanmış 9 varyantı vardır ve kansere selektif apoptotik fonksiyonu yalnızca tek bir spesifik izoformuna aittir. Yapılan bir çalışmada 3 adet TRAIL izoformu tanımlanmıştır. Bunlar yapısal olarak tam gen boyunda TRAIL alfa, ekzon 3 bulunmayan TRAIL beta ve ekzon 2 ve 3 bulunmayan TRAIL gama'dır (163).

TRAIL alfa ve TRAIL beta sitoplazmada yer alırken, TRAIL gama nükleer ve hücre membran yüzeyi yerleşimlidir.

Trunkat TRAIL izoformlarının apoptoz indükleyici etkinlikleri olmamakla birlikte, TRAIL alfa varyantının negatif efektörleri gibi davranırlar (164). Son zamanlarda, 7 adet alternatif splice ürünü trunkat TRAIL varyantları (AK, E2, E3, DA, BX424, BX439) tanımlanmıştır. Bu izoformlar apoptozu potansiyalize etme özelliğine sahip değildir. İzoformlar ortak N-terminal sekansa ve transmembran heliks yapıya sahiptirler, C-terminal bölgede farklılaşırlar. DA izoformu ekson 3'e sahip değildir ve TRAILbeta ile aynı proteini kodlar, BX424 ise ekson 3 ve 4'e sahip değildir ve TRAIL delta ile aynı proteini kodlar. BX439 ekson 2-4'den yoksundur ve TRAIL alfa ile aynı olan ekzon 1 ve 5'e sahiptir (165). Çok sayıda farklı TRAIL varyantının TRAIL reseptörü ile ilişkilerini araştıran in vitro çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.11.8. TRAIL geninde saptanan tek nükleotid polimorfizmleri

Birçok hastalıkta TRAIL gen ekspresyonunda değişiklik olduğu gösterilmiştir. Farklı popülasyonlarda bu değişikliklere yol açabilecek tek nükleotid polimorfizmleri araştıran çalışmalar mevcuttur. "Periferik kan örneklerinde yapılan SNP analizi" sonuçları, -723 pozisyonunda saptanan C/T dönüşümü sporadik meme kanseri ve azalmış TRAIL mRNA düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur (166).

Sağlıklı popülasyonda yapılan bir TRAIL geni promoter bölgesine ait tek nükleotid polimorfizmi çalışmasında, yüksek düzeyde polimorfik 4 adet SNP tespit edilmiştir. SNP'lerden SNP3 ve SNP4'ün, TRAIL upregülasyonu ile ilişkili bulunan ve kanser hastalarına uygulanan kemoterapiye cevapta rol oynayan p53 cevap elementi bölgesinde olduğu saptanmıştır (167).

Sağlıklı popülasyonda yapılan başka bir çalışmada, TRAIL ekzonlarında 3'ü 3'-UTR bölgesi 1525, 1588 ve 1595 pozisyonlarında, 2'si ekzon 1 de 192 ve 912 pozisyonlarında olmak üzere 5 adet SNP bulunmuştur. Kodlama yapan bölgede saptanan polimorfizmler amino asit sekansını değiştirmemiştir (168).

Farklı hastalıklarda TRAIL ekspresyon seviyelerindeki değişimi araştıran çalışmalar mevcuttur. Multipl skleroz ve sistemik lupus eritematozus hastalarında yapılan yapılan çalışmalarda serum solubl TRAIL düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Bu klinik gözlemlere göre, TRAIL'in "otoimmün hastalıkların patogeneğinde" rolü olduğu öne sürülmüştür (169).

Beyin metastazı olan meme kanserli olgularda TRAIL mRNA seviyelerinin down regüle olduğu gösterilmiştir. Ayrıca metastatik prostat kanseri ve kolon kanserinde de benzer şekilde TRAIL geni ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (170).

TRAIL molekülünün immün sistemdeki apoptoz süreçlerinde düzenleyici etkisi vardır. TRAIL gen ekspresyonu, interferon stimülasyonuna cevap veren kompleks transkripsiyonel mekanizmalarla düzenlenir. P53 ve Foxo3a gibi tümör supresör etkili diğer transkripsiyon faktörlerine benzer şekilde TRAIL geni düzenlenmesi de immün hücre aktivasyonu sürecinin kontrolü altındadır. TRAIL molekülünün immün sistem sinyal yollarının hangi basamaklarında nasıl etki etki gösterdiğinin ortaya konması için transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri ve TRAIL gen promoteri SNP'leri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalara ihtiyaç vardır. Antitümör etki potansiyeline sahip TRAIL geni anlatımı düzenlenme mekanizmalarının ortaya konması kanser immünolojisi çalışmalarına ve moleküler düzeyde hedefe yönelik tedavi seçenekleri araştırmalarına katkı sağlayacaktır. Farklı hastalıklarda saptanan polimorfizmlerin, TRAIL gen ekspresyonuna, tanı ve hastalık progresyonu ve tedavi yanıtı üzerine etkilerini araştıran çalışmalara ihtiyaç vardır (170).

2.11.9. Terapotik hedef olarak TRAIL reseptörleri

Proapoptotik reseptörler birçok kanser türünde eksprese edilirler. Bu nedenle kanser tedavisinde potansiyel hedeflerdir. Ekstrinsik apoptotik yolak, hücre proliferasyonu ve yaşam döngüsündeki ana düzenleyici olan p53'ün denetiminden bağımsız olarak aktive edilebilir. Bu yolağın aktiflenmesi ile, p53'te fonksiyon kaybının geliştiği durumlarda

geleneksel kemoterapiye direnç engellenebilir. Bu nedenle TRAIL'i aktive eden ajanlar, iyonize radyasyon ve kemoterapotik ajanlarla kombine kullanımı ile yeni tedavi seçenekleri geliştirilebilir. Yapılan çalışmalarda bu yaklaşımın kanser hücrelerinde apoptoz hızını arttırdığı gösterilmiştir (171).

TNF-alfa, FAS-ligand ve TRAIL, TNF superailisi üyesi ligandlardır. TNF-alfa proinflatuvar etkilerinin olması nedeniyle terapötik amaçlı kullanılamamıştır. FAS ve FAS ligand agonisti antikörler masif hepatosit apoptozuna ve ölümcül karaciğer hasarına yol açtıkları için klinik çalışmalara uygun bulunmamıştır. TRAIL reseptörleri DR4 ve DR5'i hedef alan ajanların prelinik modellerde ve faz 1 klinik çalışmalarda iyi tolere edildikleri gösterilmiştir. Bu reseptörler antitümör tedavilerin geliştirilmesi için uygun hedeflerdir (171).

2.11.10. Kanserde TRAIL ile indüklenen apoptoza karşı gelişen direnç mekanizmalar

Yapılan çalışmalarda DR4 ve DR5 reseptör düzeyleri ile apoptoz stimülasyonuna duyarlılık arasında ilişki bulunmamıştır. TRAIL'i hedef alan terapötik yaklaşımlara gelişen duyarlılık veya dirence spesifik biyobelirteçlerin bulunmasına yönelik birçok çalışma yapılmıştır. TRAIL ile indüklenen apoptoz birçok faktörden etkilenen bir süreçtir. Dekoy reseptörler olan DcR1 ve DcR2 ölüm sinyallerine aracılık etmeksizin TRAIL ile bağlanabilirler. DR4 ve DR5, posttranslasyonel O-glikozilasyon veya endositoz yoluyla "TRAIL ile indüklenen hücre ölümü" üzerine etki gösterirler. TRAIL sinyal yolunu düzenleyen diğer faktör, kaspaz-8'in epigenetik olarak susturulması veya kaspaz-8 proteininin ubiquitinasyona uğramasıdır. c-FLIP molekülü de TRAIL yolunun önemli bir inhibitör proteindir (172).

Tip 2 TRAIL ile indüklenen apoptoz yolunu kullanan tümör hücrelerinde hücre ölümü antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin overekspresyonu ile engellenebilir. Downstream kaspaz aktivasyonu XIAP ile inhibe edilebilir. Buna karşılık, "PI3K/AKT sinyal yolağının inhibisyonu" ise tümör hücrelerini TRAIL tedavisine duyarlı hale getirir ve "TRAIL direnci" etkisini geri çevirerek tedavi etkinliğini artırır (172).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Hasta Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmaya iki örnek grubu dahil edilmistir. Birinci grupta, 163 kişiden oluşan herhangi bir malignite bulgusu ve tercihen ailede kanser hikayesi olmayan sağlıklı bireyler kontrol grubuna alınmıştır.

İkinci grup ise, İstanbul Eğitim ve Arastırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği tarafından takip edilen mide kanseri tanısı konmuş 50 hastayı kapsamaktadır. Projemize dahil edilen, mide kanseri tanısı konmuş hastalarımızın, klinik, histopatolojik değerlendirmeleri ve örnek alımları yukarıda belirtilen klinik tarafından gerçekleştirilmiştir. Polimorfizm çalışması için sağlıklı ve mide kanserli bireylerin kan örnekleri EDTA'lı tüpe alınıp, "DNA izolasyonu" yapılmış ve 50 mide kanserli hasta, ve 163 sağlıklı kontrolde TRAIL C1595T, TRAIL DR4 C626G gen polimorfizmleri ve serum TRAIL düzeyleri analizleri yapılmıştır.

Mide kanserli hasta ve normal bireylerden sağlanan kan örneklerinden DNA izolasyonu amonyum asetat ve proteinaz K'nın kullanıldığı tuz çöktürme metoduyla elde edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agaroz (Promega MBG)

- Amonyum asetat (Sigma A-8920)
- "Asetik asit" (Merck K-04134156)
- Beta-merkapto-etanol (Sigma, M7522)

- Etidyum bromür (Sigma E-8751)
- Etil alkol (%99) (Merck)
- Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (Sigma, 9884)
- Hidroklorik asit (Sigma, H1758)
- Hidrojen peroksit (Sigma, 349887)
- İzopropanol (Sigma, 19516)
- Ksilen siyanol (Sigma, X4126)
- PBS (Fosfat tampon çözeltisi)
- Proteinaz K (Sigma, P2308)
- GeneDirex 100 bp DNA Ladder RTU
- Sodyum borohidrid (MERCK)
- “Sodyum Dodesil Sülfat”(SDS) (Sigma, L4390)
- Sodyum hidroksit (Merck C754962)
- Sodyum Klorid (NaCl) (Sigma, S3014)
- “Taq DNA polimeraz” (MBI Fermentas)
- Tripan mavisi (Gibco, 15250061)
- Tris Baz (BioChemika, 93362)

3.1.3. Kullanılan Kitler

- PureLink Genomic DNA Mini Kit (LifeTech)
- Abcam TRAIL ELISA kit

3.1.4. Kullanılan cihazlar

- Buzdolabı (+ 4 °C Beko, Arçelik)
- Derin Dondurucu (-20 °C Beko)
- Çeker Ocak (Opas)
- Distile su cihazı (Millipore)
- Etüv (Heraeus) (Nüve)
- Güç kaynağı (Stratagene)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Isı bloğu (Fisher scientific model111004)
- Masaüstü mini santrifüj (Eppendorf) (Hettich)
- Otomatik pipetler (Gilson) (Eppendorf)(Thermo)
- PZR cihazı (Thermal Cycler) (BioRad)
- PH metre (Corning)
- Spektrofotometre (NanoDrop)
- Su banyoları (Fisher scientific)
- Laminar kabin (Hepa filtreli) (Thermo, Scientific)
- İnkübatörler (37°C-56°C Elektro Mag)
- Masaüstü mini Santrifüj (Hettich)
- Orbital çalkalayıcı (Thermo, Scientific)
- Elektroforez Sistemi (E-C 350 MIDICELL)
- Güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation)
- Mikrodalga fırın (Philco)
- UV transilluminator (Stratagene UV/White light)

3.1.5. Kullanılan tampon solüsyonları ve çözeltiler

Eritrosit Parçalama Çözeltisi (Red Blood Lysis buffer, RBL):

8,74 gram Amonyum klorür

1 gram Potasyum bikarbonat

200 µl 0,5 M Etilen diamintetraasetat (EDTA)

Tartımları yapılarak erlen içine alındı. 900 ml distile su eklendi ve çözeltinin pH'sı 1N NaOH ile 7,4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak 1 litreye tamamlandı.

Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktarılaraq 120 °C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

Lökosit Parçalama Çözeltisi (White Blood Lysis buffer, WBL):

25 ml 4 M NaCl

50 mL 0,5 M Etilendiaminasetat (EDTA)

Balon jojeye konularak 1 litreye tamamlandı. 120 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

• Amonyum Asetat (9M NH₄Ac) :

732.26 g NH₄Ac

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp, sterilizasyon için 0.2 mikronluk filtreden geçirilerek oda ısısında saklandı.

• Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) %10 (pH 7.2)

10 gram Sodyum Dodesil Sülfat tartıldı. Beher içine alınarak üzerine 80 ml distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözdürüldü ve pH'sı 7,2'ye ayarlandı. Sterilizasyon için 0.2 mikronluk filtreden geçirildi ve oda ısısında saklandı.

• Proteinaz K (20mg/ml):

20 mg Proteinaz K tartılarak steril bir tüp içinde steril distile su kullanılarak 1 ml'ye tamamlandı. -20 °C'de saklandı.

• **Etilen Diamin Tetra Asetikasit (EDTA 0.5 M)**

186,1 gram Etilendiamintetraasetat (EDTA) tartılarak beher içine alındı ve 800 ml distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürüldü ve pH'sı NaOH çözeltisi ile 8,0'e ayarlanarak distile su ile 1 litreye tamamlandı. 120 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

• **Tris EDTA (TE) pH: 8.0:**

10 ml 1 M Tris-HCL (pH 8.0)

20 ml 0.5 M EDTA

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavlanarak oda ısısında saklandı.

• **Tris-HCL pH 8.0:**

121.1 g Tris-HCL distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. pH'ı HCl ile 8.0'a ayarlandı.

• **Etidyum Bromür (10 mg/ml)**

1 gram Etidyum bromür tartılarak steril distile su ile 10 ml'ye tamamlandı

• **5 X TBE (Tris baz-Borik asit-EDTA)**

54 gram Tris baz ve 27,5 gram borik asit tartılarak beher içine aktarıldı. Üzerine 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ve 800 ml distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözelti balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı ve 120 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Dna İzolasyonu

3.2.1.1. Tuzla Çöktürme Yöntemi ile DNA İzolasyonu

Periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındıktan sonra çalışma için falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:3 oranında (30 ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve +4 °C'de 20 dakika bekletildi. +4 °C'den çıkarılan örneklerin 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları atıldı ve pelletleri tamamen süspanse edilerek üzerlerine baştaki hacmin 2 katı kadar (15-20 ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklendi. Örnekler 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atılarak süspanse edildi. Süspanse olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS, 50 µl proteinaz K (20mg/ml) ve 10 ml lökosit parçalama çözeltisi (WBL) eklenerek 56 °C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üzerlerine 3,7 ml 9,5 M Amonyum asetat çözeltisi eklenerek hafifçe karıştırıldı ve 4500 rpm'de 20-30 dakika santrifüj edildi. DNA içeren üst kısım falkon tüplere alındı çökelti atıldı. Falkon tüpe alınan üst kısmın üzerine 2 katı hacimdeki %99'luk etil alkol eklendi. Alkolün eklenmesiyle yüzeye çıkmaya başlayan DNA bir pipet ucuyla yakalandı ve 1,5 ml'lik ependorf tüpüne alındı. Üzerine dH₂O eklendi ve DNA çözdürüldü. DNA kalitesinin belirlenmesi için NanoDrop spektrofotometrede konsantrasyon ölçümleri yapıldı. DNA'lar -20 °C'de saklandı.

3.2.1.2. Kit ile DNA İzolasyonu

Su banyosu veya ısı bloğu 55 °C'ye ayarlandı. Ependorf tüpüne 200 µl kan örneği koyuldu. Örneğe 20 µl Proteinaz K ve 20 µl RNase A eklendi. Kısa süreli olarak vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Üzerine 200 µl liziz/bağlayıcı tampon eklendi ve homojen bir solüsyon elde edene kadar vortekslenerek iyice karıştırıldı. Karışım 55 °C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra karışıma 200 µl %96-100 etanol eklendi ve kısa süre vortekslenerek karıştırıldı. %96-100 etanol yıkama tamponu 1 ve yıkama tamponu 2'ye eklendi, iyice karıştırıldı ve oda ısısında saklandı. Liziz/bağlayıcı tampon ve etanol ile hazırlanan karışım spin kolonuna eklendi. Kolon oda ısısında 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 500 µl etanollü yıkama tamponu 1 eklendi. Kolon oda ısısında 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon oda ısısında 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 500 µl etanollü yıkama tamponu 2 eklendi. Kolon oda ısısında maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı. Spin kolon steril bir 1,5 ml'lik ependorfa yerleştirildi. Kolona 200 µl elüsyon tamponu eklendi. Oda ısısında 1 dakika inkübe edildi. Kolon oda ısısında maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Başka bir steril 1,5 ml'lik ependorfa tekrar 200 µl elüsyon tamponu eklendi ve kolon oda ısısında maksimum hızda 1,5 dakika santrifüj edildi. Ependorf içinde DNA bulunmaktadır. Kolon çıkarılır ve atılır. DNA'lar -20 °C'de saklandı.

3.2.2. DNA KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

DNA konsantrasyonunun ve saflığının tespit edilmesi için spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda ısı ışığı soğurma (OD) ölçümü yapıldı. 260nm'deki OD/280 nm'deki OD oranı hesaplanarak DNA'nın saflık derecesi bulundu.

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

DNA örneklerinin saflığı OD260/ OD280 oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD260/ OD280 değeri yaklaşık 1.8'dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1.8'den küçük olacaktır. OD260/ OD280 değeri 2'den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelir.

3.2.3. TRAIL C1595T (rs1131580) GEN BÖLGESİNİN PZR İLE ÇOĞALTILMASI

3.2.3.1. TRAIL C1595T (rs1131580) Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılmasında Kullanılan Primer Dizileri

TRAIL 1595 ilgili gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir.

İleri primer: 5'- TGA GCA CTA CAG CAA ACA TGA -3'
Geri primer: 5'- GCA CCA CTA AAA GAT CGC AGT -3'

3.2.4. TRAIL-DR4 C626G (rs20575) Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması

3.2.4.1. TRAIL DR4 C626G (rs20575) Gen bölgesinin PZR ile Çoğaltılmasında Kullanılan Primer Dizileri

TRAIL DR4 ilgili gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir.

İleri primer: 5'-AAG GTC AAG GGA GAC GTC AGG -3'
Geri primer: 5'-GCT TCT GTG GTT TCT TTG AGG -3'

3.2.5. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (POLYMERASE CHAIN REACTION-PZR)'DA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE PZR'IN HAZIRLANIŞI

DNA Taq polimeraz enzimi (5 U/ μ l) (Intron Biotechnology, i-StarTaq™ DNA Polymerase): PZR reaksiyonundaki son konsantrasyonu 1 ünite olacak şekilde 25 μ l'lik PZR reaksiyonuna eklendi.

3.2.5.1. PZR Karışımının Hazırlanışı

Toplam reaksiyon hacmi 25 μ l olacak şekilde TRAIL için Tablo 3.1'de belirtilen bileşenler sırası ile 0,5 ml'lik steril tüpe koyuldu. PZR karışımının hazırlanma işlemlerinin hepsi buz üzerinde soğukta ve steril kabin içerisinde yapıldı.

Tablo 3.1: PZR Karışımının İçeriği

PZR Karışımı	dH ₂ O	Mg Free	MgCl ₂ (25 mM)	dNTP (2,5 mM)	İleri primer (10 pmol/ μ l)	Geri primer (10 pmol/ μ l)	Taq polimeraz (5 U/ μ l)
Miktar	17,5 μ l	2,5 μ l	1,75 μ l	1,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,3 μ l

Hazırlanan PZR karışımından örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 24 μ l reaksiyon karışımı dağıtıldı. Daha sonra her tüpe 1 μ l DNA eklendi ve daha önceden 95 °C sıcaklığa çıkarılmış PZR cihazına (Biorad Thermal Cycler) örnekler yerleştirildi ve PZR işlemi başlatıldı.

3.2.5.2. PZR Koşulları

TRAIL 1595 gen polimorfizmini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 57 °C sıcaklık kullanıldı (Tablo 3.2).

TRAIL 1595 gen polimorfizmini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 58 °C sıcaklık kullanıldı (Tablo 3.3).

Tablo 3.2: TRAIL C1595T Gen Polimorfizmi İncelemesi İçin PZR Reaksiyon Koşulları

Ön Denatürasyon	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	94 °C	45 sn	} 35 Döngü
Primer Bağlanması	58 °C	45 sn	
Zincir Uzaması	72 °C	45 sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	

Tablo 3.3: TRAIL DR4 C626G Gen Polimorfizmi İncelemesi İçin PZR Reaksiyon Koşulları

Ön Denatürasyon	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	94 °C	45 sn	} 35 Döngü
Primer Bağlanması	59 °C	45 sn	
Zincir Uzaması	72 °C	45 sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	

3.2.6. %2'LİK AGARÖZ JEL HAZIRLANMASI

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

3.2.6.1. PZR Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi

%2'lik jel hazırlandıktan sonra 1xTBE tamponu içeren jel tankı içine uygun şekilde koyuldu. Agaröz jelin üzerini 2-3 ml geçecek şekilde 1xTBE tamponu jel üzerine eklendi. 7 µl PZR ürününe, 3 µl 6xLoading Dye (Intron Biotechnology) eklenip pipetleme yapılarak karıştırıldı.

10 µl'lik örnek karışımı kuyucuklara sırasıyla yüklendi. Yükleme işleminden sonra jel tankının kapağı kapatıldı. Güç kaynağı (E-Capparatüs Corporation, E-C4000P) 250 miliamper 120 volt elektrik gücüne ayarlanarak elektroforez jel yürütülmesi gerçekleştirildi.

3.2.6.2. PZR Ürünlerinin Kontrolü

TRAIL 1595 ve TRAIL DR4'e ait hedef gen bölgeleri ile ilgili PZR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla PZR tüplerinden alınan 7 µl örnek 3 µl 6xLoading Dye (Intron Biotechnology) ile karıştırılarak yukarıda tanımlanan elektroforez sisteminde yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel UV ışık altında (304 nm dalga boyunda) PZR ürünleri incelendi ve fotoğrafı UV transillüminator düzeneğinde çekildi. PZR

reaksiyonları sonucu TRAIL geninden 391 bp'lik, TRAIL DR4 geninden ise 220 bp'lik bir ürün elde edilmesi beklendi.

3.2.7. TRAIL GENİ 5 İNCİ EKZON 3'UTR BÖLGESİNİN PCR ÜRÜNLERİNDE Rsa I ENZİM KESİMİ

3.2.7.1. RsaI Enzim Kesiminde Kullanılan Enzimler ve Kimyasal Maddeler

RsaI Kesim enzimi (10 U/μl) (Thermo Fisher Scientific):

RsaI enzimi 10X Buffer Tango tamponu ile birlikte kullanıldı. RsaI enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



3.2.7.2. RsaI Enzim Kesimi

PZR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacmi 10 μl olacak şekilde restriksiyon enzim kesimi Tablo 4'de belirtilen çözeltilerin ve RsaI enziminin sırasıyla eklenmesi ile gerçekleştirildi. 391 baz çiftlik PZR ürünü kesimi RsaI enzimiyle 37 °C'de 2,5 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi.

Tablo 3.4: RsaI enzim kesimi içeriği

Kesim Karışımı	dH ₂ O	10X Buffer Tango Tamponu	RsaI enzimi (10 U/μl)	PZR ürünü
Miktar	1,5 μl	1,4 μl	0,3 μl	5 μl

3.2.7.3. %2'lik Agaroz Jel Hazırlanması

6 gr agaroz (Promega MBG) tartılarak erlen içine koyuldu. Üzerine son hacim 200 ml olacak şekilde 1xTBE tamponu eklenerek, mikrodalga fırında kaynatma yolu ile

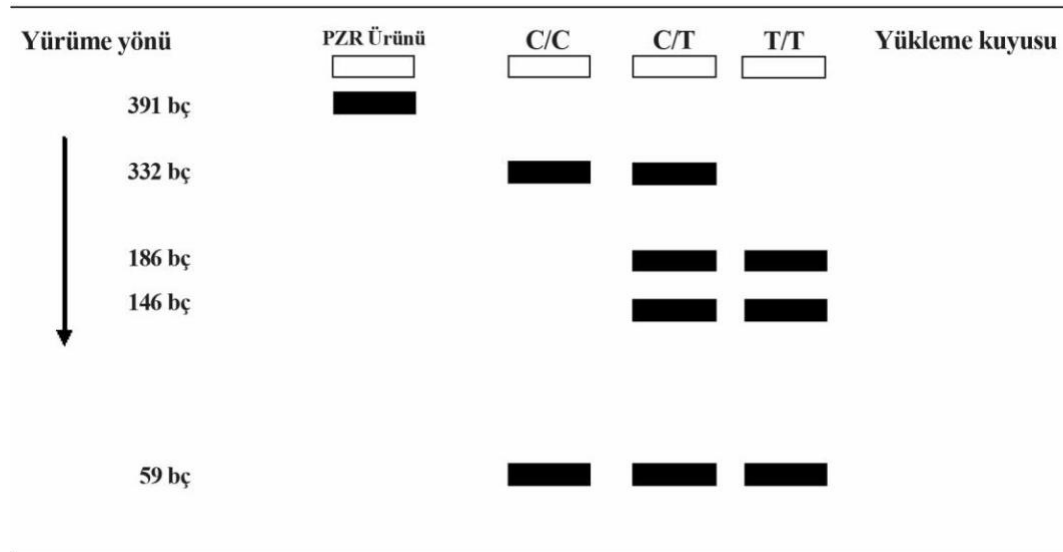
çözdürüldü. Erlenin sıcaklığı elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde (50-55°C) çözünmüş agaroz jel içine 4,5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilave edildi. Hazırlanan jel yatay jel yatağı içine dökülerek, yükleme kuyuklarının oluşması için tarak yerleştirilerek donmaya bırakıldı. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel örnek yüklenmesi için hazır duruma geldi.

3.2.7.4. RsaI Enzim Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi

%3'lük agaroz jel hazırlandıktan sonra Rsa I kesim enzimi ile kesilen PZR ürününden 5 µl ve 2 µl 6xLoading Dye (Intron Biotechnology) alınarak karıştırılıp %2'lik agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. Kesim ürünleri DNA moleküler marker (GeneDirex 100 bç DNA Ladder RTU) ile birlikte 37°C de 1 saat yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar UV ışık (304 nm) altında incelendi.

3.2.7.5. RsaI Enzim Kesim Ürünlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü

C/T mutasyonu varlığında TRAIL 5. ekzonun 3'-UTR bölgesinde birden fazla RsaI kesim bölgesi oluşmaktadır. C/C genotipi için PZR kesim ürünleri 332 bç ve 59 bç büyüklüğünde iki bant verirken, homozigot T/T mutasyonu içeren PZR kesim ürünleri 186 bç, 146 bç ve 59 bç olmak üzere üç bant verir. Heterozigot C/T mutasyonu içeren PZR kesim ürünleri ise 332, 186, 146 ve 59 bç olmak üzere dört bant verir (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: TRAIL geni 5. Ekzon 3'-UTR bölgesi PZR ürününün ve RsaI enzim kesimini takiben oluşan bantların agaroz jeldeki muhtemel şematik görüntüsü

3.2.8. TRAIL-DR4 4. EKZON 3'UTR BÖLGESİNİN PCR ÜRÜNLERİNDE DraIII ENZİM KESİMİ

3.2.8.1. DraIII Enzim Kesiminde Kullanılan Enzimler ve Kimyasal Maddeler

DraIII Kesim enzimi (10 U/ μ l) (Thermo Fisher Scientific):

DraIII enzimi 10X Buffer G tamponu ile birlikte kullanıldı. DraIII enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



3.2.8.2. DraIII Enzim Kesimi

PZR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacmi 10 μ l olacak şekilde restriksiyon enzim kesimi Tablo 3.5'de belirtilen çözeltilerin ve DraIII enziminin sırasıyla eklenmesi ile gerçekleştirildi. 220 baz çiftlik PZR ürünü kesimi DraIII enzimiyle 37 °C'de 90 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi.

Tablo 3.5: DraIII enzim kesimi içeriği

Kesim Karışımı	dH ₂ O	10X Buffer G Tamponu	DraIII enzimi (10 U/ μ l)	PZR ürünü
Miktar	4,5 μ l	0,5 μ l	0,3 μ l	5 μ l

3.2.8.3. %2'lik Agaroz Jel Hazırlanması

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

3.2.8.4. DraIII Enzim Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi

%3'lük agaroz jel hazırlandıktan sonra DraIII kesim enzimi ile kesilen PZR ürününden 5 µl ve 2 µl 6xLoading Dye (Intron Biotechnology) alınarak karıştırılıp %2'lik agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. Kesim ürünleri DNA moleküler marker (Fermentas pUC 19/Msp1 100 bç) ile birlikte yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar UV ışık (304 nm) altında incelendi.

3.2.8.5. DraIII Enzim Kesim Ürünlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü

C/G mutasyonu varlığında (arginin aminoasidi treonine dönüşür) TRAIL-DR4 geni 4. ekzonu 3'-UTR bölgesinde birden fazla spesifik DraIII enzimi kesim bölgesi oluşmaktadır. C/C (wild type) varyantı ''PZR kesim ürünleri'' 164 bç ve 56 bç büyüklüğünde iki bant verirken, homozigot G/G varyantı PZR kesim ürünleri 220 bç olmak üzere tek bant, heterozigot C/G varyantı PZR kesim ürünleri ise 220 bç, 164, 56 bç'lik tek bir bant verir (Şekil 3.2)

Yürüme Yönü.	PZR Ürünü	C/C	C/G	G/G
220 bç				
164 bç				
56 bç				

Şekil 3.2: TRAIL-DR4 geni 4. Ekzon 3'-UTR bölgesi PZR ürününün ve DraIII enzim kesimini takiben oluşan bantların agaroz jeldeki muhtemel şematik görüntüsü

3.3. TRAIL PLAZMA DÜZEYİ ELISA ÖLÇÜMÜ

“Abcam Human TRAIL ELISA” kiti kullanılarak hasta/kontrol plazma örneklerinde sandviç ELISA metodu ile TRAIL düzeyleri ölçümü yapıldı.

3.3.1 Metod Prensibi

Plazma örneği eldesi için EDTA'lı tüpe alınan tam kan örnekleri 1000g 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ependorflara alınarak çalışma gününe kadar -20 derecede saklandı. Çalışma gününde reaktif ve örnekler oda sıcaklığına getirildi.

Referans standarttan 1ml alınarak üzerine 1 ml örnek dilüenti eklendi. 10 dk beklendikten sonra alt üst edilerek homojenizasyonu sağlandı. Tamamen çözünen stok standardın konsantrasyonu 1000 pg/ml olarak elde edildi. Seri dilüsyonlar yapılarak 1000-500-250-

125-62,5-31,25-15,63-0 pg/ml lik standardlar hazırlandı. 30 ml'lik yıkama solüsyonu 720 ml distile su ile dilüe edildi. Konsantre biyotinize antikor (10X), antikor dilüenti ile 1/10 oranında dilüe edildi. Konsantre HRP Konjugatı (100X, 120µL), spesifik dilüenti ile 1/100 olarak sulandırıldı.

Hazırlanan standard ve plazma örnekleri, insan TRAIL monoklonal antikor kaplı plate kuyucuklarına eklendi, inkübe edildi. Örnek yüklü kuyucukların her birine biyotinize edilmiş TRAIL spesifik sekonder antikor ve avidin- Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugatı eklendi ve inkübe edildi. Bağlanmayan antikorlar yıkama prosedürü ile uzaklaştırıldı. Yıkama işlemini takiben her kuyucuğa substrat eklendi. Kuyucuklarda meydana gelen mavi renk enzim-substrat reaksiyonunu durduran stop solüsyonun eklenmesi ile sarı renge dönüştü. 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma yapıldı. Her örneğe ait optik dansite değerleri (OD) ile doğru orantılı olan TRAIL düzeyleri kantitatif olarak standard eğrisi kullanılarak hesaplandı.

3.4. BULGULARIN İSTATİSTİK DEĞERLENDİRME METODLARI

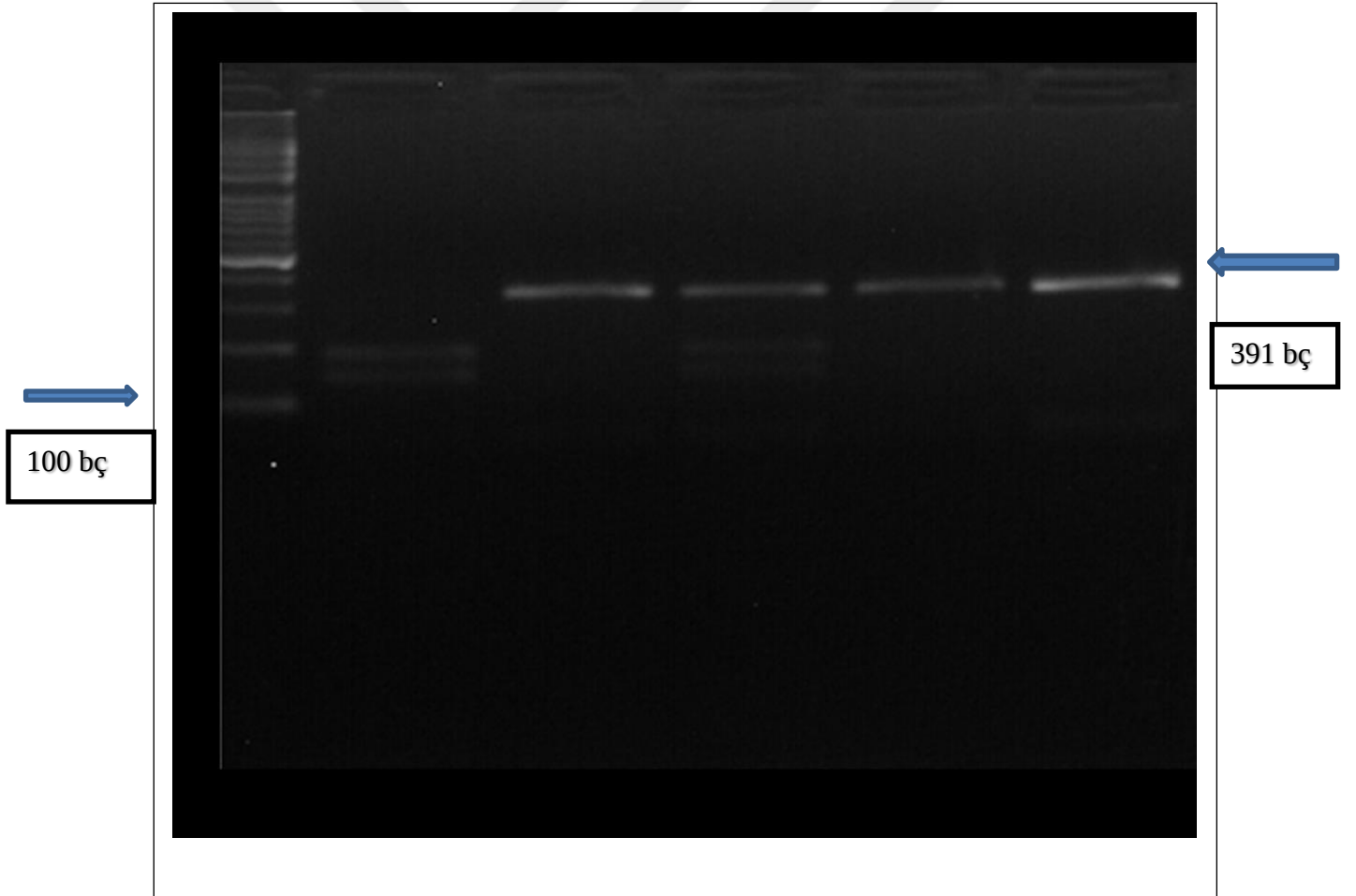
Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 7,5 paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alınmış olup TRAIL, TRAIL DR4 genotipleri ile allellerinin görülme sıklığının, gruplar arası farklılıklarla beraber değerlendirilmesinde Ki Kare (χ^2), sayısal verilerin analizi için ise student-t testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. PCR ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR

4.1.1. TRAIL ekzon 5'in 3'UTR bölgesinin PZR ürünü ile ilgili bulgular

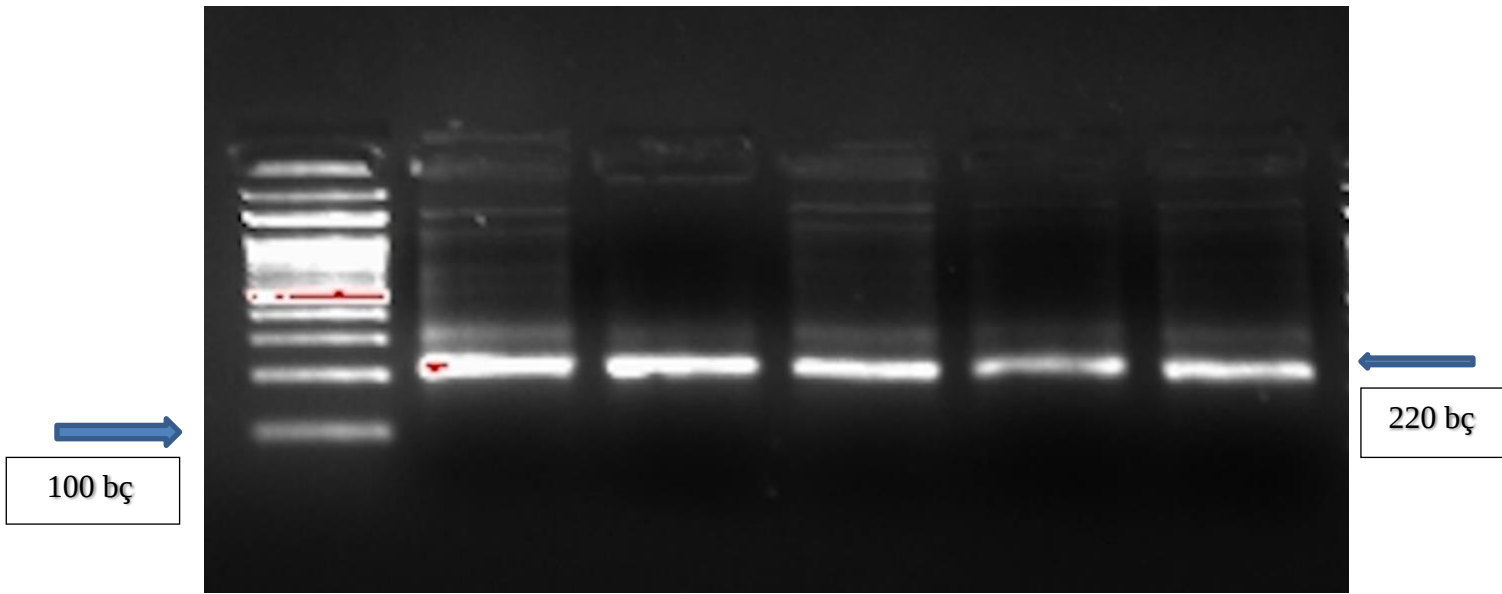
TRAIL ekzon 5'in 3'UTR bölgesi PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde 391 bç'lik spesifik PCR ürününe ait bant elde edildiğinin gözlenmesi üzerine RsaI enzimi ile kesim yapıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: TRAIL ekzon 5 3'UTR bölgesi PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: GeneDirex 100 bp DNA Ladder RTU

4.1.2. TRAIL-DR4 ekzon 4'ün 3'UTR bölgesinin PZR ürününe ait bulgular

TRAIL-DR4 ekzon 4'ün 3'UTR bölgesi PzR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde 220 bç'lik spesifik PZR ürününe ait bant elde edildiğinin gözlenmesi üzerine DraIII enzimi ile kesim yapıldı (Şekil 3.4)

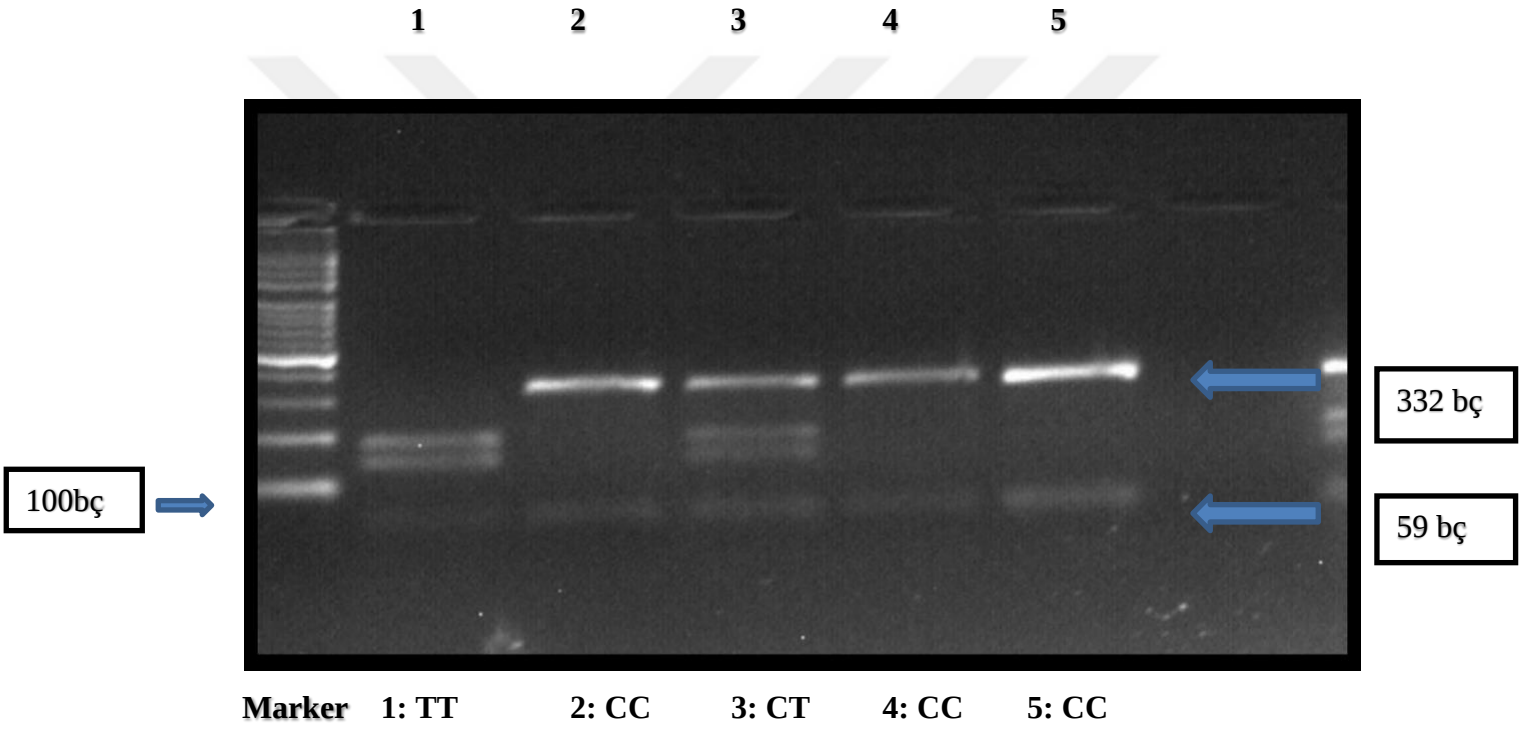


Şekil 3.4: TRAIL-DR4 ekzon 4 3'UTR bölgesinin PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntü bulguları. Marker: GeneDirex 100 bç DNA Ladder RTU

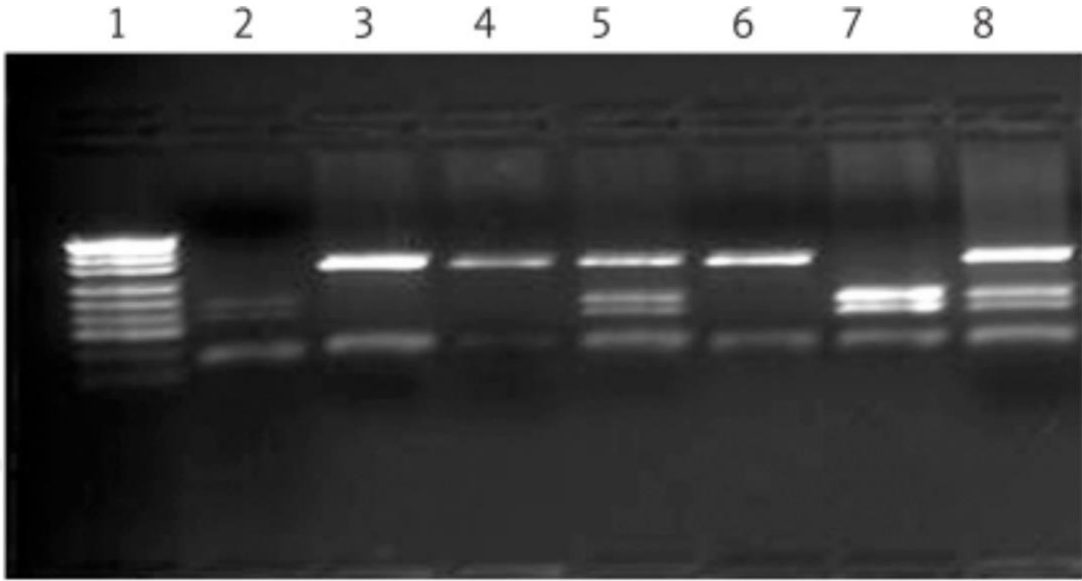
4.1.3. TRAIL C1595T RsaI enzim kesim ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntü bulguları. Marker: GeneDirex 100 bç DNA Ladder RTU

TRAIL geni 5. ekzon 3'-UTR bölgesine ait PZR ürünleri %3'lük agaroz jelle yüklenip kontrol edilmesini takiben, PZR ürünlerinin Rsa I ile enzim kesimi gerçekleştirildi. Rsa I enzim kesimi sonrası kesim ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezde yürütüldü. Rsa I enzim kesimi sonrası agaroz jelde yürütülen PZR ürünlerinden CC genotipinin 332 bç ve 59 bç büyüklüğünde iki band verdiği gözlemlendi. TT genotipinde 186 bç, 146 bç ve 59 bç

büyükliğinde olmak üzere 3 band saptandı. CT genotipinin ise 332, 186, 146, ve 59 bç büyükliğinde 4 band verdiği saptandı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: TRAIL C1595T kesim ürünleri genotiplerine ait agaroz jel bulguları



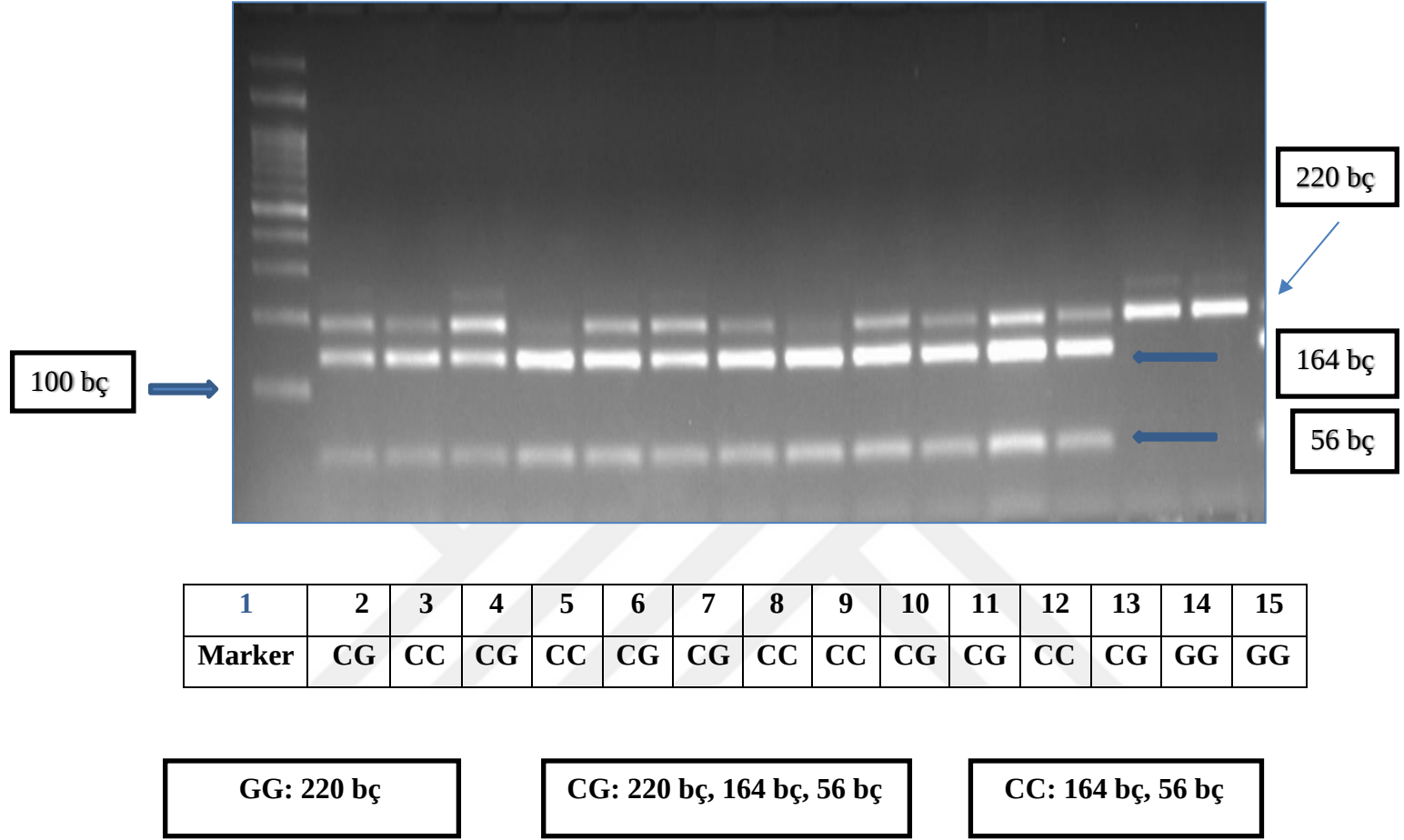
1: pUC19/MspI Marker, 2: TT homozygote, 3,4: CC homozygote, 5: CT heterozygote

6: CC homozygote 7: TT homozygote 8: CT heterozygote

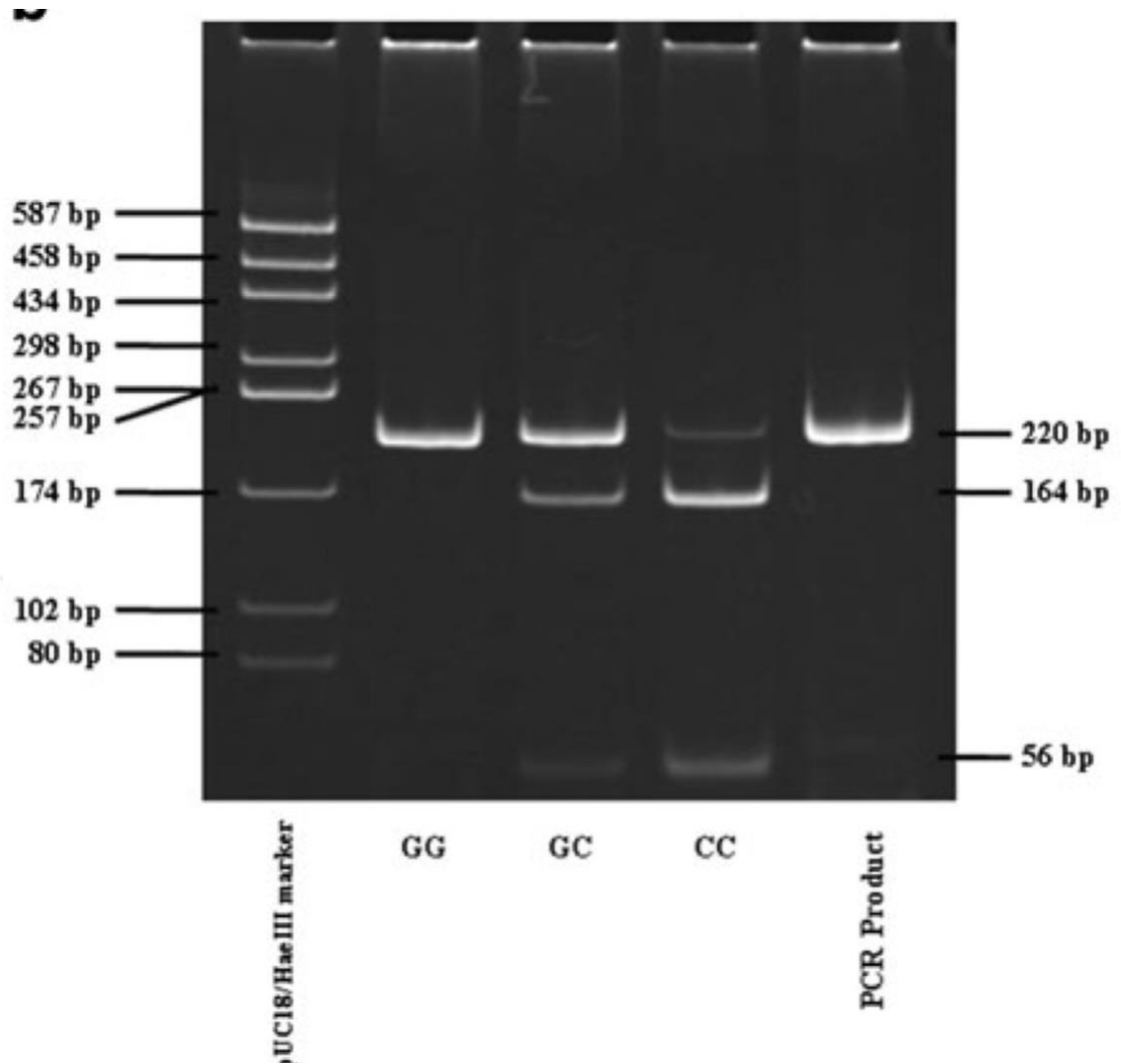
Yıldız et al. (2010) Is there any correlation between TNF-related apoptosis- inducing ligand (TRAIL) genetic variants and breast cancer? Arch Med Sci 6, December/2010

4.1.4. TRAIL-DR4 C626G DsaIII enzim kesim ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntü bulguları

TRAIL-DR4'ün 4. ekzon 3'-UTR bölgesine ait PZR ürünlerinin %22lik agaroz jele yüklenip kontrol edilmesini takiben, PZR ürünlerine DraIII ile enzim kesimi uygulandı. DraIII enzim kesimi sonrası elde edilen kesim ürünleri %3'lük agaroz jel elektroforezde yürütüldü. Agaroz jelde yürütülen PZR ürünlerinden CC genotipinin 164 bp ve 56 bp büyüklüğünde iki band verdiği gözlemlendi. GG genotipinde, 220 bp büyüklüğünde olmak üzere tek band saptandı. CG genotipinin ise 220 bp, 164 bp, 56 bp büyüklüğünde 3 band verdiği saptandı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: TRAIL-DR4 C626G kesim ürünleri genotiplerine ait agaroz jel bulguları



Taştemir-Korkmaz,D., Demirhan,O., Kuleci,S. and Hastürk,S. (2013) There is no significant association between death receptor 4 (dr4) gene polymorphisms and lung cancer in Turkish population. *Pathol. Oncol. Res.*, 10.1007/s12253-013-9643-z.

4.2. KLİNİK VE DEMOGRAFİK VERİLERİN İSTATİSTİK DEĞERLENDİRMESİ İLE ELDE EDİLEN BULGULAR

Çalışma grubuna dahil edilen mide kanserli olguların (n=50) ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılımları Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Buna göre mide kanserli hastaların %24’ü erkeklerden, %76’sı kadınlardan; kontrol grubunun ise %38,7’si erkeklerden, %61,3’ü kadınlardan oluşmaktaydı. Gruplar yaş parametresine göre değerlendirildiğinde, hasta grubunda yaş ortalaması 58,48±11,32; kontrol grubu yaş ortalaması ise 53,81± 15,19 olarak saptandı. Hasta ve kontrol grubu arasında yaş ve cinsiyet parametreleri açısından istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.1)

Tablo 4.1: Çalışma grubunun yaş ve cinsiyet verileri.

		Hasta (n= 50)	Kontrol (n= 163)	p
Yaş Ortalama ± (S.D)		58,48 ± 11,32	53,81 ± 15,19	p>0,05
Cinsiyet n (%)	Kadın	38 (76)	100 (61,3)	p>0,05
	Erkek	12 (24)	63 (38,7)	

n: birey sayısı; tablodaki değerler X+SE olarak verilmiştir; gruplararası analiz student t testi ve Ki Kare (χ^2) ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.2: Mide kanseri hastalarının klinik verileri.

Klinik veriler %	
Tümör Evresi	
I	1 (2)
II	3 (6)
III	22 (44)
IV	24 (48)
Lenf Nodu Metastaz	
N0	5 (10)
N1	12 (24)
N2	21 (42)
N3	12 (24)
Uzak Metastaz	
Var	13 (26)
Yok	37 (74)
Tümör Lokalizasyonu	
Kardiya	% (8,7)
Artnum	% (30,4)
Korpus	% (43,5)
Diğer	% (17,4)
Perinöral İnvazyon	
Var	% (12)
Yok	% (88)

Tümör Histolojisi	
Adenokarsinom	% (61,1)
Taşlı yüzük	% (38,9)

Çalışma grubuna dahil edilen mide kanserli olgularda hastalığın klinik bulguları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Tümör evresi parametresine göre mide kanserli olguların %2’si T1, %3’ü T2, %22’si T3, %48’i T4 olarak bulundu. “Lenf nodu metastazına” göre olguların %10’u N0, %24’ü N1, %42’si N3, %24’ü N4 olarak değerlendirildi. Hastaların %26’ında uzak metastaz saptandı. Tümör lokalizasyonu değerlendirmesine göre olguların %8,7’sinde kardiya, %30,4’ünde antrum, %43,5’unda korpus yerleşimli ve %17,4’ünde diğer alanlarda olmak üzere tümör mevcuttu. Hastaların %12’sinde perinöral invazyon vardı. Tümör histolojisine göre olguların %61,1’inde adenokarsinom, %38,9’unda taşlı yüzük hücreli tümör saptandı (Tablo 4.2).

Tablo 4.3. Mide Kanseri Hasta ve Kontrol Grubunda TRAIL 1595 C/T Polimorfizmine Ait Genotip ve Allel Dağılımları

Genotip ve Allel	Hasta n (%)	Kontrol n (%)	P
Genotip Frekansı			
CC (%)	30 (60)	96 (58,9)	= 0,256
TT (%)	5 (10)	7 (4,3)	
CT (%)	15 (30)	60 (36,8)	

Allel Frekansı			
C (%)	75 (75)	252 (77,3)	=0,633
T (%)	25 (25)	74 (22,7)	

Çalışma grubuna dahil edilen hasta ve kontrol grubunun TRAIL 1595 C/T polimorfizmlerin ait genotip ve allel dağılımları Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Hasta grubunda allel dağılım frekansları %75 C, %25 T alleli, kontrol grubunda ise %77,3 C, %22,9 T alleli olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol gruplarına ait allel frekans dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,256$). Hasta grubu genotip frekans dağılımları %60 CC, %10 TT, %30 CT olarak bulunmuştur. Hasta grubunda ise genotip frekansı dağılımları %58,9 CC, %4,3 TT, %36,8 CT olarak bulunmuştur. Gruplar arası genotip frekans dağılımları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,633$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.4. Mide Kanseri Hasta ve Kontrol Grubunda TRAIL DR-4 C626G Polimorfizmine Ait Genotip ve Allel Dağılımları

Genotip ve Allel	Hasta n (%)	Kontrol n (%)	P
Genotip Frekansı			
GG (%)	20 (40)	56 (34,4)	= 0,189
GC (%)	20 (40)	87 (53,4)	
CC (%)	10 (20)	20 (12,3)	
Allel Frekansı			
G (%)	60 (60)	199 (61)	=0,851
C (%)	40 (40)	127 (39)	

Çalışma grubuna dahil edilen hasta ve kontrol grubunun TRAIL DR-4 polimorfizmlerine ait genotip ve allel dağılımları Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Hasta grubunda allel dağılım frekansları %60 G, %40 C alleli, kontrol grubunda ise %61 G, %39 C alleli olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol gruplarına ait allel frekans dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,851$) (Tablo 4.4).

Hasta grubu genotip frekans dağılımları %40 GG, %40 GC, %20 CC olarak bulunmuştur. Hasta grubunda ise genotip frekansı dağılımları %34,4 GG, %53,4 GC, %12,3 CC olarak bulunmuştur. Gruplar arası genotip frekans dağılımları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,189$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.5: TRAIL 1595 C/T polimorfizmi genotiplerinin hastaların klinik verileri üzerinde dağılımı.

Klinik Parametreler/ Genotipler	CC (%)	CT (%)	TT (%)	p
Cinsiyet				
Kadın	9 (75)	1 (8,3)	2 (16,7)	$p>0,05$
Erkek	21 (55,3)	14 (36,8)	3 (7,9)	
Tümör Evresi				
III/IV	27 (58,7)	14 (30,4)	5 (10,9)	$p>0,05$
I/II	3 (75)	1 (25)	0 (0)	
Lenf Nodu Tutulumu				
N+	26 (57,8)	14 (31,1)	5 (11,1)	$p>0,05$
N-	4 (80)	1 (20)	0 (0)	

Uzak Metastaz				
Var	7 (53,8)	4 (30,9)	2 (15,4)	p>0,05
Yok	23 (62,2)	11 (29,7)	3 (8,1)	
Perinöral İnvazyon				
Var	4 (66,7)	2 (33,3)	0 (0)	p>0,05
Yok	26 (59,1)	13 (29,5)	5 (11,4)	

TRAIL 1595 C/T polimorfizmi genotiplerinin hastaların klinik verileri üzerindeki dağılımları Tablo 4.5'te gösterilmiştir. Hasta grubunda kadınların genotip dağılım yüzdeleri sırasıyla %75 CC, %8,3 CT, %16,7 GT; erkeklerde ise genotip dağılım yüzdeleri %55,3 CC, % 36,8 CT, %7,9 TT olarak bulunmuştur. Genotip dağılımları açısından kadın ve erkek hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tümör evresi 3 ve 4 olan hasta grubunda genotip dağılım yüzdeleri %58,7 CC, %30,4 CT, %10,9 CT olarak bulunmuştur. Tümör evresi 1 ve 2 olan hasta grubunda ise genotip dağılımları %75 CC, %25 CT olarak bulunmuştur. Bu grupta TT genotipi varlığı saptanmamıştır. Tümör evrelerine göre oluşturulan grupların genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Lenf nodu tutulumu varlığı ve yokluğuna göre genotip dağılım yüzdeleri, tutulum olan grupta %57,8 CC, %31,1 CT, %11,1 TT – tutulum olmayan grupta %80 CC, %20 CT olarak bulunmuştur. Tutulum olmayan grupta TT genotipi varlığı saptanmamıştır. Gruplar arası genotip dağılımları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Uzak metastaz varlığı ve yokluğuna göre genotip dağılım yüzdeleri, metastaz olmayan grupta %62,2 CC, % 29,7 CT, % 8,1TT ; metastaz olan grupta ise %53,8 CC,

%30,9 CT, %15,4 TT olarak bulunmuştur. Grupların genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.5).

Perinöral invazyon varlığı ve yokluğuna göre genotip dağılım yüzdeleri, perinöral invazyon olmayan grupta %59,1 CC, %29,5 CT, %11,4 TT, perinöral invazyon olan grupta %66,7 CC, %33,3 CT olarak bulunmuştur. Bu grupta TT genotipi varlığı saptanmamıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.6: TRAIL DR-4 polimorfizmi genotiplerinin hastaların klinik verileri üzerinde dağılımı.

Klinik Parametreler/ Genotipler	GG (%)	GC (%)	CC (%)	p
Cinsiyet				
Kadın	6 (50)	4 (33,3)	2 (16,7)	$p>0,05$
Erkek	14 (36,8)	16 (42,1)	8 (21,1)	
Tümör Evresi				
III/IV	18 (39,1)	18 (39,1)	10 (21,7)	$p>0,05$
I/II	2 (50)	2 (50)	0 (0)	
Lenf Nodu Tutulumu				
N+	19 (42,2)	17 (37,8)	9 (20)	$p>0,05$
N-	1 (20)	3 (60)	1 (20)	
Uzak Metastaz				
Var	8 (61,5)	5 (38,5)	0 (0)	

Yok	12 (32,4)	15 (40,5)	10 (27)	p>0,05
Perinöral İnvazyon				
Var	0 (0)	3 (50)	3 (50)	p>0,05
Yok	20 (45,5)	17 (38,6)	7 (15,9)	

TRAIL DR-4 polimorfizmi genotiplerinin hastaların klinik verileri üzerindeki dağılımları Tablo 4.6’da gösterilmiştir. Hasta grubunda kadınların genotip dağılım yüzdeleri sırasıyla %50 GG, %33,3 GC, %16,7 CC – erkeklerde ise genotip dağılım yüzdeleri %36,8 CC, %42,1 CT, % 21,1 TT olarak bulunmuştur. Genotip dağılımları açısından kadın ve erkek hastalar arasında “istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır” (p>0,05).

Tümör evresi 3 ve 4 olan hasta grubunda “genotip dağılım yüzdeleri” %39,1 GG, %39,1 GC, %21,7 CC olarak bulunmuştur. Tümör evresi 1 ve 2 olan hasta grubunda ise genotip dağılımları %50 GG, %50 GC olarak bulunmuştur. Bu grupta CC genotipi varlığı saptanmamıştır. Tümör evrelerine göre oluşturulan grupların genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (p>0,05).

Lenf nodu tutulumu varlığı ve yokluğuna göre genotip dağılım yüzdeleri, tutulum olan grupta %42,2 GG, %37,8 GC, %20 CC – tutulum olmayan grupta %20 GG, %60 GC, %20 CC olarak bulunmuştur. Gruplar arası genotip dağılımları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır (p>0,05).

Uzak metastaz varlığı ve yokluğuna göre genotip dağılım yüzdeleri, metastaz olmayan grupta %32,4 GG, % 40,5 GC, % 27 CC ; metastaz olan grupta ise %61,5 GG, %38,5 GC olarak bulunmuştur. Bu grupta CC genotipine rastlanmamıştır. Grupların genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (p>0,05).

Perinöral invazyon varlığı ve yokluğuna göre genotip dağılım yüzdeleri, perinöral invazyon olmayan grupta %45,5 GG, %38,6 GC, %15,9 CC, perinöral invazyon olan

Grupta % 50 GC, % 50 CC olarak bulunmuştur. Bu grupta GG genotipi varlığı saptanmamıştır. Grupların genotip dağılımları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.7: Hasta ve kontrol grubunda TRAIL serum düzeyleri.

Serumda	Hasta	Kontrol	<i>p</i>
TRAIL düzeyi (pg/ml)	490,74 ± 196	641,07 ± 56,93	=0,331

Hasta ve kontrol grubu serum TRAIL düzeyleri Tablo 4.7’de gösterilmiştir. Hasta grubunda serum TRAIL düzeyleri 490,74+ 196 pg/ml, kontrol grubunda ise 641,07+56,93 pg/ml olarak bulunmuştur. Grupların serum TRAIL düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,331$) (Tablo 4.7).

5. TARTIŞMA

Fizyolojik koşullar altında immün sistem, tümöral transformasyona uğrayan hücreleri TRAIL aracılığıyla indüklenen apoptotik sürece yönlendirerek anormal hücre büyümesini kontrol altında tutar. TRAIL/APO2L, TNF süperaillesinden olup kanser hücrelerini spesifik olarak yok eden tip II transmembran bir proteindir. Rekombinant TRAIL'in farelerde yapılan çalışmalarda tümör büyümesini baskıladığı ve yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir. Bu nedenle TRAIL yolağı anti-kanser tedavilerde umut verici bir hedef olarak görülmektedir (173).

TRAIL, reseptörleri olan DR4 (TRAIL-R1) ve DR5'e (TRAIL-R2) (intraselüler ölüm domaini içerirler) bağlanarak kaspaz-8 ve Fas-ilişkili ölüm domaini (FADD) aracılığı ile apoptotik yolağı aktive eder. Devamında, ölüm-indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşur, bu da diğer downstream kaspazları aktive ederek hücre ölümüne yol açar. Bunun dışında sağkalım ve hücre proliferasyonunu NF-kB, protein kinaz B/Akt ve MAP-Kinaz yollarının aktivasyonu üzerinden uyarmaktadır. TRAIL geni, 3q26 kromozomunda yer alan ve yaklaşık olarak 1,77 kb mRNA kodlayan 5 ekzona, 4 introna sahip bir gendir. Yapılan çalışmalarda translasyona uğramayan 3' bölgenin (3'UTR) TRAIL gen düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. TRAIL ekzonlarında birçok farklı tek nükleotid polimorfizmi (SNP) saptanmış olup bunların 4'ü 3'UTR bölgesinde 1289 (C1289A), 1525 (G1525A), 1588 (G1588A) ve 1595 (C1595T) lokuslarındadır. Diğer iki SNP'nin ise 1192 ve 5912 bölgelerinde ekzon 1'de olduğu gösterilmiştir. Bu iki varyasyonda aminoasit sekansı değişmemektedir. Son zamanlarda, farklı tümör tiplerinde TRAIL yolağındaki SNP'lerin prognostik önemine odaklanan çalışmalar yapılmaktadır (173).

5 adet TRAIL reseptörü mevcuttur. Bunlardan biri olan TRAIL DR4 (TRAIL-R1), TNF reseptör ailesi üyesi olup görevi, eksojen uyarıyı transmembran yüzey reseptörleri aracılığıyla ölüm sinyallerini üreten ve kontrol eden hücre içi sinyal yollarına bağlamaktır. Bu yollar majör olarak ekstrinsik apoptotik sinyal yollarıdır. DR4 sistince zengin ekstraselüler ligand bağlayıcı bölge ve apoptoz indükleyici sitoplazmik ölüm domaini içeren tek transmembran heliks yapıda bir

proteindir. Ölüm reseptör sinyal iletimindeki herhangi bir aksama apoptoza dirençle sonuçlanabilir. Bu durum kanseri tetikleyen hücrel savunma defektlerinden biridir (174). Bu nedenle ölüm reseptörlerinde meydana gelen epigenetik değişikliklerin fonksiyon kaybı veya protein downregülasyonu ve dolayısıyla suboptimal apoptotik kapasite ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Özellikle reseptörlerde meydana gelen tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) fonksiyonel değişimlere yol açarak kanser patogeneğinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Farklı kanser türlerinde yapılan çalışmalarda bu değişimlerin varlığı ile kanser riski arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. DR4 ektodomaininde meydana gelen DR4 C626G (rs4871857), A683C (rs17088993) ve A1322G (rs2230229) polimorfizmlerinin farklı kökenlere ait primer tümörlerde, kontrol olgulara göre daha yüksek sıklıkta olduğu gösterilmiştir. Bu polimorfizmlerin sırasıyla, DR4 ektodomaininde, sisteince zengin ekstraselüler domainde ve DR4 ölüm domaininde (DD) olduğu saptanmıştır (173).

Timirci-Kahraman ve arkadaşları, 91 mesane kanserli hastada TRAIL C1595T ve TRAIL-DR4 C626G polimorfizmleri ile mesane kanseri riski ve klinik parametreler arasındaki ilişkiyi incelemiş, kontrol grubu ile hasta grubuna ait TRAIL C1595T genotip frekansları arasında anlamlı fark bulmuşlardır. TRAIL 1595TT genotipinin kontrol grubunda 6.9 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır. TRAIL 1595CT genotipi mesane kanserli hastalarda kontrol grubuna kıyasla 1.9 kat daha yüksek bulunmuştur. TRAIL C alleli varlığı mesane kanseri gelişimi için “yüksek risk faktörüdür”. Ayrıca gözlenen genotipler ile TRAIL-DR4 626 C/G allel frekansları tüm gruplarda Hardy-Weinberg eşitliği ile uyumlu bulunmuştur. TRAIL 1595C/T ve DR4 626 C/G genotipleri ile tümör karakteristikleri ve klinik parametreler arasındaki ilişki incelenmiştir. “Yüksek grade mesane tümörlü hastalarda” DR4 GG genotipi, düşük grade hastalardan istatistiksel anlamlı olarak 2.1 kat yüksek bulunmuştur. DR4 GG genotipinin kanser gelişiminde risk faktörü olmaktan çok klinik olarak kötü prognostik faktör olduğu saptanmıştır. Düşük grade hastalarda ise DR4 GC genotipi 0.6 kat yüksek bulunmuştur. Çalışmada ayrıca, TRAIL ve TRAIL-DR4 genotip kombinasyonlarının mesane kanseri gelişimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. TRAIL 1595 CC (%32) ve DR4 626 CG (%27) allelleri tüm gruplarda en sık gözlenen alleller olarak bulunmuştur. Hasta grubunda TRAILCT-DR4GG allelleri, kontrol grubundan 2.2 kat yüksek bulunmuştur (174). Çalışmamızda,

hasta grubu CC genotip frekans sıklığı %60 olarak bulundu. İleri evre tümörlerde CC genotip frekans sıklığı %58,7, CT genotip frekans sıklığı ise %38,6 olarak bulundu. Hasta ve kontrol grupları genotip frekans sıklıkları arasında “anlamlı fark bulunamadı”. TRAIL DR4 C626G polimorfizmi incelemesinde ise, ileri evre tümürlü olgularda GG ve GC genotip frekans sıklıkları eşit (%39,1) bulundu. Lenf tutulumu olanlarda GG genotip frekans sıklığı %42,2, uzak metastazı olanlarda ise %61,5 olarak bulundu. Hasta ve kontrol grupları arasında genotip frekans sıklıkları açısından anlamlı fark bulunamadı.

Frank ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, meme kanseri riski ile DR4 C626G polimorfizmi arasında ilişki bulamamışlardır. Bununla beraber başka bir çalışmalarında kronik hepatitli hastalarda hepatoselüler karsinom riski ile DR4 626C alleli arasında ilişki saptamışlardır. Başka bir çalışmalarında ise TRAIL DR4 CG genotipinin azalmış kolorektal kanser riski ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (175).

Hazra ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, hafif sigara içen DR4 626GG genotipi saptanmış genç kadınlarda mesane kanseri riskinde azalma göstermişlerdir (176).

Fisher ve arkadaşları çalışmalarında, DR4 C626G polimorfizmini akciğer, baş-boyun tümörü riski ile ilişkili bulmuşlardır. Mesane kanserine karşı ise koruyucu özellikte olduğunu göstermişlerdir (177).

Fernandez ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, DR4 626G alleli varlığının mantle hücreli lenfoma riskine karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir (178).

Erbaşoğlu ve arkadaşlarının 158 küçük hücreli dışı akciğer kanserli (NSCLC) hasta ile kontrol grubu 100 katılımcıda yaptıkları çalışmada, TRAIL moleküler yolağının NSCLC patogenezindeki ve prognozundaki rolünü incelemişlerdir. Bu amaçla TRAIL genotipleri, allel frekansları dağılımları ve TRAIL gen ekspresyonu düzeylerini saptayarak bu değişkenler ile tümörün histopatolojik özellikleri arasında ilişkiyi araştırmışlardır. Gruplar arasında TRAIL C1595T heterozigot ve homozigot genotip frekansları arasında istatistiksel anlamlı fark bulamamışlardır. Küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada hasta grubunda TRAIL C1595T CT+TT mutant genotipi frekansını daha düşük bulunmuştur. T mutant allel frekansının hasta grubunda daha yüksek olduğunu saptanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre T allelinin kanser yatkınlığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Mide adenokarsinomlu hastalarda yapılan diğer

bir çalışmada ise T alleli taşıyıcılığı ile ileri evre karsinom arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (179).

Yıldız ve arkadaşlarının meme kanserli hastalarda yapılan başka bir çalışmalarında, TRAIL C1595T CT genotipi frekansını ileri evre tümörlü hastalarda daha düşük olarak bulmuşlardır. TRAIL 1595 CC genotipinin meme kanseri riskini arttırdığını göstermişlerdir (180).

Piras-Straub ve arkadaşlarının hepatoselüler kanserli hastalarda yaptıkları çalışmada, hastaların %66'sında tümör dokusundaki TRAIL mRNA ekspresyonunu çevre sağlıklı dokudan daha düşük olarak saptamışlardır. Ayrıca TRAIL ekspresyonunun yüksek derece ve ileri evre kanser ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Çalışma sonucu olarak TRAIL'in hepatoselüler karsinom gelişiminde ve rekürrens ve sağkalımda önemli bir faktör olduğu belirtilmiştir. Daha geniş hasta serisinde TRAIL polimorfizmi ve dokudaki ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkinin gösterilmesinin gerekli olduğu bildirilmiştir (181).

Taşdemir Korkmaz ve arkadaşlarının akciğer kanserli hastalarda yaptıkları çalışmada, TRAIL-DR4'ün sisteince zengin ekstraselüler domain, ölüm domaini ve ektodomaininde missense değişim saptamışlardır. Çalışmada literatürde mevcut olan tüm "TRAIL-DR4 gen polimorfizmleri" (G422A, C626G, A683C, A1322G) tüm gruplarda incelenmiştir. Çalışmamızda da analiz edilen TRAIL DR4 C626G CG ve GG genotip frekanslarının gruplar arasında anlamlı farklılık göstermediği tespit edilmiştir (182).

Chen ve arkadaşlarının yaptığı farklı kanser türlerinden 2874 olgu ve 3220 kontrolü kapsayan meta-analiz çalışmasında, TRAIL DR4 C626G polimorfizminin kanser gelişimi açısından risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada TRAIL DR4 A1322G AG ve GG varyant genotipleri, incelenen tüm kanser türlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olarak bulunmuştur (183).

Horak ve arkadaşlarının 97 epitelyal over tümörlü hastada yaptıkları çalışmada, 3 farklı TRAIL DR4 polimorfizmini (G422A, C626G, A1322G) analiz etmişlerdir. Yaş, etnisite açısından benzer olan hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulamamışlardır (184).

Dick ve arkadaşları 557 BRCA1+ ve 283 BRCA2+ meme kanserli olguda yaptıkları çalışmada, C626G polimorfizmi ile meme kanseri riski arasında bir ilişki

bulamamışlardır. Oysa Elubina ve arkadaşları ve Frank ve arkadaşları çalışmalarında bu bulguların aksi yönde sonuçlar elde ederek homozigot 683C alleli taşıyan BRCA2+ olgularda meme kanseri riskinin daha az olduğunu saptamışlardır (185).

Ulybina ve arkadaşları, ve Martinez-Ferrandis ve arkadaşları da Dick ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde TRAIL-DR4 C626G polimorfizmi ile meme kanseri gelişme riski arasında anlamlı bir ilişki saptayamamışlardır (186).

Rai ve arkadaşları 400 mesane kanserli hastada yaptıkları olgu-kontrol çalışmasında TRAIL-DR4 C626G polimorfizmi ile “kanseri gelişimi riski” arasında ilişki bulamamışlardır (187).

Mittal ve arkadaşları çalışmalarında DR4 A683C polimorfizmi ile mesane kanseri riski arasında anlamlı ilişki tespit etmişlerdir (188).

Rehman ve arkadaşlarının 363 meme kanserli hasta ve benzer yaşlarda 193 kontrol grubunda yaptıkları çalışmada gruplar arasında TRAIL 1595 CC homozigot varyant sıklığı açısından fark bulmamışlardır. TT genotipi ise meme kanserli grupta daha yüksek bulunmuş olup, kanser gelişimi açısından risk faktörü olarak gösterilmiştir (189).

Wang ve arkadaşları, Çin toplumunda mide kanserli 304 hastada TRAIL 1525 (G1525A ve C1595T) polimorfizmleri ile mide kanseri klinik parametreleri arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Mide kanserli olgularda TRAIL A, T alleli taşıyıcılığını sağlıklı kontrol grubundan anlamlı düşük bulmuşlardır. Bu bulgular, TRAIL 1525A ve TRAIL 1595T alleli taşıyıcılığının mide kanserine karşı koruyucu olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmada kötü diferansiye olgularda her iki allel taşıyıcılığının da anlamlı düşük olduğu saptanmıştır. TRAIL 1525A ve 1595T allellerinin hücre diferansiyasyonu ve tümör derecesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda tümör evreleri ile genotip dağılımları ve allel frekansları arasında ilişki bulunmamıştır (190)

Kuraoka ve arkadaşları Japon toplumunda mide kanserli 270 hastada yaptıkları çalışmada TRAIL-DR4 C626G gen polimorfizmi ile mide kanseri ilişkisini araştırmışlardır. Hasta grubunda TRAIL-DR4 C626G CC, CG, GG genotip dağılımlarını sırasıyla %92, %21, %6 olarak bulmuşlardır. Homozigot GG ve heterozigot CG genotipleri CC genotipi ile karşılaştırıldığında hastalık riski açısından anlamlı fark bulunamamıştır. Olguların genotip dağılımlarına göre klinik parametreleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Bu çalışmaya benzer olarak çalışmamızda, hasta grubunda

anlamli olmamakla birlikte CC genotip dagilimi en yuiksek olarak bulunmuştur. Ayrıca genotip dagilimleri ile klinik karakteristikler arasında anlamli iliski bulunamamıştır (191).

Verim ve arkadaşları çalışmalarında 99 larinks kanserli hastada TRAIL C1595T ve C626G gen polimorfizmleri ile serum TRAIL düzeylerini incelemişlerdir. Hasta ve kontrol grupları arasında TRAIL 1595 C/T genotip ve allel frekansları açısından anlamli fark bulunamamışlardır. Bununla birlikte gruplar TRAIL-DR4 C626G genotip ve allel frekansları açısından incelendiğinde, CC homozigot wild tip genotip larinks kanserli hastalarda 3,73 kat olarak anlamli yuiksek bulunmuştur. CG genotipinde hastalık riski ise diğer genotiplere göre 0,72 kat düşük bulunmuştur. TRAIL, TRAIL-DR4 genotipleri ile tümör karakteristikleri ve klinik parametreler arasında anlamli bir iliski tespit edilememiştir. Larinks kanserli olgular ile sağlıklı kontrol grubu serum TRAIL düzeyleri arasında anlamli fark bulunamamıştır. Benzer şekilde çalışmamızda, TRAIL, TRAIL-DR4 genotip dagilimleri ve sTRAIL düzeyleri arasında hasta ve kontrol grubu arasında anlamli fark bulunamamıştır (192).

Chen ve arkadaşları Kafkas ırkında C626G, A683C ve A1322G gen polimorfizmleri ile kanser riski arasındaki iliskiyi inceleyen çalışmalardan derledikleri meta-analizde, A683C CC ve AC genotiplerinde ve C626G CC genotipi varlığında kanser riskinin yuiksek olduğunu bulunmuştur. A1322G genotipi farklı genetik modelleri ile kanser riski artışı arasında bir iliski bulunamamıştır (193).

Yaylın ve arkadaşları kolorektal kanserli hastalarda yaptıkları çalışmada, sağlıklı ve hasta grup TRAIL C1595T genotipleri arasında anlamli fark bulunmamakla birlikte, homozigot CC+TT genotip frekansları ile ileri evre kanser arasında iliski saptanmıştır. T3-T4 ileri evre kanserli olgularda CC genotipi 1,75 kat yuiksek bulunmuştur. İleri evre tümürlü olgularda homozigot genotip varlığı CT genotipine kıyasla 1,85 kat yuiksek bulunmuştur. Genotipler ile prognostic parametreler arasında anlamli iliski bulunamamıştır. Çalışmamızda da bu bulgulara benzer olarak TRAIL 1595 genotipleri ile klinik parametreler arasında bir iliski bulunamadı. Aynı çalışmada, tüm genotip gruplarında sTRAIL düzeyleri çalışılmış olup, en düşük sTRAIL düzeyleri CT genotipinde saptanmıştır. CT genotipi aynı zamanda kötü prognostik kriterlerle birliktelik göstermektedir. Bulgular birlikte değerlendirildiğinde, sTRAIL düzeyi düşük

CT genotipe sahip olgularda apoptotik süreçlerde yetersizlik olduğunu düşündürmektedir (194).

Bu çalışmada TRAIL ve TRAIL-DR4 gen polimorfizmlerine ek olarak serum TRAIL düzeyleri araştırılmıştır. Literatürde çeşitli kanser türlerinde sTRAIL düzeylerini inceleyen çalışmalar mevcuttur.

Kargi ve arkadaşlarının 18 adenokarsinomlu, 22 skuamöz hücreli evre IV akciğer kanserli olgularda yaptıkları çalışmada hasta grupta sTRAIL düzeyleri kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte sTRAIL düzeyleri ile sağkalım arasında ilişki bulunmamıştır. Adenokarsinom olgularında sTRAIL düzeyleri ile yaş ve sigara öyküsü arasında ilişki saptanmıştır (195).

Bisgin ve arkadaşları, kolon kanserli olgularda bevazizumab tedavisine yanıt ile sTRAIL düzeyleri arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Tedaviye yanıt veren olgularda sTRAIL düzeyleri anlamlı yüksek bulunmuştur. Grupların TRAIL düzeyleri arasındaki bu farklılık, kanser hücrelerinde apoptozu indükleyen bevazizumab tedavi etkinliğinin bir sonucu olarak değerlendirilmiştir. Buna göre TRAIL düzeyleri sağkalım öngördürücü bir biyomarker olabileceği belirtilmiştir (196).

Yapılan çalışmaların sonuçları değişkenlik göstermektedir. TRAIL sinyal yolağı aktivitesi her dokuda farklıdır. Buna ek olarak dışlama ve dahil etme kriterlerindeki klinik varyasyonlar, etnik, demografik, çevresel ve kalıtsal predispozan faktörlerin varlığı, çalışma sonuçlarındaki tutarsızlıkları açıklamaktadır. Bu nedenle bu faktörlerin etkilerinin araştırmaya dahil edildiği geniş çaplı hasta serilerinde yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

TRAIL ve reseptörleri normal mide mukoza membranında, mide epitelinde eksprese edilmektedir. TRAIL gen polimorfizmlerinin sağlıklı ve kanserli dokudaki TRAIL mRNA ekspresyonu veya TRAIL protein düzeyindeki etkisi henüz aydınlatılamamıştır. Buna ek olarak, atrofik gastrit, intestinal metaplazi ve displazi gibi prekanseröz durumların varlığında dokuda TRAIL polimorfizmi ve TRAIL mRNA ekspresyon seviyelerinin, doku/serum sTRAIL düzeylerinin araştırılması, prognoz takibinde kullanılacak biyomarker araştırmalarına katkı sağlayacaktır.

6- KAYNAKLAR

1. Yin,M., Hu,Z., Tan,D., Ajani,J.A. and Wei,Q. (2009) Molecular epidemiology of genetic susceptibility to gastric cancer: Focus on single nucleotide polymorphisms in gastric carcinogenesis. *Am. J. Transl. Res.*
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19966937>
2. Hu,K. and Chen,F. (2012) Identification of significant pathways in gastric cancer based on protein-protein interaction networks and cluster analysis. *Genet. Mol. Biol.*, 10.1590/S1415-47572012005000045.
<https://doi.org/10.1590/S1415-47572012005000045>
3. Grabsch,H.I. and Tan,P. (2013) Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms. *Dig. Surg.*, 10.1159/000350876.
<https://doi.org/10.1159/000350876>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23867592>
4. Yu,C.-Y. and Chen,H.-Y. (2015) Genetic Variations and Gastric Cancer. *Gastrointest. Tumors*, 10.1159/000431265.
<https://doi.org/10.1159/000431265>
5. Zheng,W., Zhang,S., Zhang,S., Min,L., Wang,Y., Xie,J., Hou,Y., Tian,X., Cheng,J., Liu,K., *et al.* (2017) The relationship between tumor necrosis factor- α polymorphisms and gastric cancer risk: An updated meta-analysis. *Biomed. Reports*, 10.3892/br.2017.934.
<https://doi.org/10.3892/br.2017.934>
6. Rosero G,C.Y., Corredor,M. and Mejía O,L. (2016) A review of polymorphisms in genes involved in the development of gastric cancer. *Rev. Colomb. Gastroenterol.*, 10.22516/25007440.114.
<https://doi.org/10.22516/25007440.114>
7. Katona,B.W. and Rustgi,A.K. (2017) Gastric Cancer Genomics: Advances and Future Directions. *CMGH*, 10.1016/j.jcmgh.2017.01.003.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.01.003>
8. Zheng,L., Wang,L., Ajani,J. and Xie,K. (2004) Molecular basis of gastric cancer development and progression. *Gastric Cancer*, 10.1007/s10120-004-0277-4.
<https://doi.org/10.1007/s10120-004-0277-4>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15224192>
9. Lochhead,P. and El-Omar,E.M. (2008) Gastric cancer. *Br. Med. Bull.*, 10.1093/bmb/ldn007.
<https://doi.org/10.1093/bmb/ldn007>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18267927>

10. Tsugane, S. and Sasazuki, S. (2007) Diet and the risk of gastric cancer: Review of epidemiological evidence. In *Gastric Cancer*.
<https://doi.org/10.1007/s10120-007-04200><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17577615>

11. Noto, J.M., Gaddy, J.A., Lee, J.Y., Piazzuelo, M.B., Friedman, D.B., Colvin, D.C., Romero-Gallo, J., Suarez, G., Loh, J., Slaughter, J.C., *et al.* (2013) Iron deficiency accelerates *Helicobacter pylori*-induced carcinogenesis in rodents and humans. *J. Clin. Invest.*, 10.1172/JCI64373.
<https://doi.org/10.1172/JCI64373>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23257361>

12. Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., *et al.* (2008) Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 10.1073/pnas.0711183105.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0711183105>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18192401>

13. Amieva, M.R., Vogetmann, R., Covacci, A., Tompkins, L.S., Nelson, W.J. and Falkow, S. (2003) Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* (80-.), 10.1126/science.1081919.
<https://doi.org/10.1126/science.1081919>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12775840>

14. Nomura, A.M.Y., Wilkens, L.R., Henderson, B.E., Epplein, M. and Kolonel, L.N. (2012) The association of cigarette smoking with gastric cancer: The multiethnic cohort study. *Cancer Causes Control*, 10.1007/s10552-011-9854-0.
<https://doi.org/10.1007/s10552-011-9854-0>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037905>

15. Kaneda, A., Matsusaka, K., Aburatani, H. and Fukayama, M. (2012) Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. *Cancer Res.*, 10.1158/0008-5472.CAN-11-3919.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3919>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22761333>

16. Oliveira, C., Pinheiro, H., Figueiredo, J., Seruca, R. and Carneiro, F. (2015) Familial gastric cancer: Genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncol.*, 10.1016/S1470-2045(14)71016-2.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71016-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71016-2)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25638682>

17. Hansford, S., Kaurah, P., Li-Chang, H., Woo, M., Senz, J., Pinheiro, H., Schrader, K.A., Schaeffer, D.F., Shumansky, K., Zogopoulos, G., *et al.* (2015) Hereditary diffuse gastric cancer syndrome: CDH1 mutations and beyond. *JAMA Oncol.*, 10.1001/jamaoncol.2014.168.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2014.168>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26182300>

18. Bellini, M.F., Cadamuro, A.C.T., Succi, M., Proença, M.A. and Silva, A.E. (2012) Alterations of the TP53 gene in gastric and esophageal carcinogenesis. *J. Biomed.*

Biotechnol., 10.1155/2012/891961.

<https://doi.org/10.1155/2012/891961>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919278>

19. Oki,E., Zhao,Y., Yoshida,R., Egashira,A., Ohgaki,K., Morita,M., Kakeji,Y. and Maehara,Y. (2009) The difference in p53 mutations between cancers of the upper and lower gastrointestinal tract. In *Digestion*.

<https://doi.org/10.1159/000167864>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19153488>

20. van der Post,R.S., Vogelaar,I.P., Carneiro,F., Guilford,P., Huntsman,D., Hoogerbrugge,N., Caldas,C., Chelcun Schreiber,K.E., Hardwick,R.H., Ausems,M.G.E.M., *et al.* (2015) Hereditary diffuse gastric cancer: Updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J. Med. Genet.*, 10.1136/jmedgenet-2015-103094.

<https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103094>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25979631>

21. Yasui,W., Oue,N., Kuniyasu,H., Ito,R., Tahara,E. and Yokozaki,H. (2001) Molecular diagnosis of gastric cancer: Present and future. *Gastric Cancer*, 10.1007/PL00011733.

<https://doi.org/10.1007/PL00011733>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11760076>

22. Tahara,E. (2004) Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci. Publ.*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15055305>

23. Zang,Z.J., Cutcutache,I., Poon,S.L., Zhang,S.L., Mcpherson,J.R., Tao,J., Rajasegaran,V., Heng,H.L., Deng,N., Gan,A., *et al.* (2012) Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes. *Nat. Genet.*, 10.1038/ng.2246.

<https://doi.org/10.1038/ng.2246>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22484628>

24. Lee,Y.S., Cho,Y.S., Lee,G.K., Lee,S., Kim,Y.W., Jho,S., Kim,H.M., Hong,S.H., Hwang,J.A., Kim,S. young, *et al.* (2014) Genomic profile analysis of diffuse-type gastric cancers. *Genome Biol.*, 10.1186/gb-2014-15-4-r55.

<https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-4-r55>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24690483>

25. Kakiuchi,M., Nishizawa,T., Ueda,H., Gotoh,K., Tanaka,A., Hayashi,A., Yamamoto,S., Tatsuno,K., Katoh,H., Watanabe,Y., *et al.* (2014) Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat. Genet.*, 10.1038/ng.2984.

<https://doi.org/10.1038/ng.2984>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24816255>

26. Meining,A., Morgner,A., Miehke,S., Bayerdörffer,E. and Stolte,M. (2001) Atrophy-metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in the stomach: A reality or merely an hypothesis? *Bailliere's Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 10.1053/bega.2001.0253.

<https://doi.org/10.1053/bega.2001.0253>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11866488>

27. Ranzani,G.N., Padovan,L.S., Calistri,D., Renault,B., Luinetti,O., Burrel,M., Fiocca,R., Solcia,E. and Amadori,D. (1995) P53 Gene Mutations and Protein Nuclear Accumulation Are Early Events in Intestinal Type Gastric Cancer but Late Events in Diffuse Type. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7606196>

28. Wang,J.Y., Lin,S.R., Hsieh,J.S., Hsu,C.H., Huang,Y.S. and Huang,T.J. (2001) Mutations of p53 gene in gastric carcinoma in Taiwan. *Anticancer Res.*
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11299797>

29. Machlowska,J., Puculek,M., Sitarz,M., Terlecki,P., Maciejewski,R. and Sitarz,R. (2019) State of the art for gastric signet ring cell carcinoma: from classification, prognosis, and genomic characteristics to specified treatments. *Cancer Manag. Res.*, **Volume 11**, 2151–2161.
<https://doi.org/10.2147/CMAR.S188622>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30936747>

30. Hanna,N.N, Mentzer,R.M. (2003) Molecular genetics and management strategies in hereditary cancer syndromes. *J. Ky. Med. Assoc.*
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12674901>

31. Höfler,H. and Becker,K.F. (2003) Molecular mechanisms of carcinogenesis in gastric cancer. *Recent Results Cancer Res.*, 10.1007/978-3-642-59349-9_5.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-59349-9_5
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12790321>

32. Yokozaki,H., Yasui,W. and Tahara,E. (2001) Genetic and epigenetic changes in stomach cancer. *Int. Rev. Cytol.*, 10.1016/S0074-7696(01)04003-7.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(01\)04003-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(01)04003-7)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11243597>

33. Lee,J.H., Abraham,S.C., Kim,H.S., Nam,J.H., Choi,C., Lee,M.C., Park,C.S., Juhng,S.W., Rashid,A., Hamilton,S.R., *et al.* (2002) Inverse relationship between APC gene mutation in gastric adenomas and development of adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.*, 10.1016/S0002-9440(10)64216-2.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64216-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64216-2)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163385>

34. Toyota,M., Ahuja,N., Ohe-Toyota,M., Herman,J.G., Baylin,S.B. and Issa,J.P.J. (1999) CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 10.1073/pnas.96.15.8681.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8681>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411935>

35. Ohta,M., Inoue,H., Cotticelli,M.G., Kastury,K., Baffa,R., Palazzo,J., Siprashvili,Z., Mori,M., McCue,P., Druck,T., *et al.* (1996) The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell*, 10.1016/S0092-8674(00)81034-X.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81034-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81034-X)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598045>

36. Graziano,F., Cascinu,S., Staccioli,M.P., Catalano,V., Rossi,M.C., Baldelli,A.M., Giordano,P., Muretto,P. and Catalano,G. (2001) Potential role and chronology of abnormal expression of the Deleted in Colon Cancer (DCC) and the p53 proteins in the development of gastric cancer. *BMC Cancer*, 10.1186/1471-2407-1-9.
<https://doi.org/10.1186/147124071-9>
37. Park,W.S., Oh,R.R., Park,J.Y., Lee,J.H., Shin,M.S., Kim,H.S., Lee,H.K., Kim,Y.S., Kim,S.Y., Lee,S.H., *et al.* (2000) Somatic mutations of the trefoil factor family 1 gene in gastric cancer. *Gastroenterology*, 10.1053/gast.2000.16483.
<https://doi.org/10.1053/gast.2000.16483>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10982763>
38. Bossenmeyer-Pour  ,C., Kannan,R., Ribieras,S., Wendling,C., Stoll,I., Thim,L., Tomasetto,C. and Rio,M.C. (2002) The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J. Cell Biol.*, 10.1083/jcb200108056.
<https://doi.org/10.1083/jcb200108056>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12034770>
39. Hara,T., Ooi,A., Kobayashi,M., Mai,M., Yanagihara,K. and Nakanishi,I. (1998) Amplification of c-myc, K-sam, and c-met in gastric cancers: Detection by fluorescence in situ hybridization. *Lab. Investig.*, 10.11501/3155960.
<https://doi.org/10.11501/3155960>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759658>
40. Nakajima,M., Sawada,H., Yamada,Y., Watanabe,A., Tatsumi,M., Yamashita,J., Matsuda,M., Sakaguchi,T., Hirao,T. and Nakano,H. (2000) The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas [1] (multiple letters). *Cancer*, 10.1002/(SICI)1097-0142(20000101)88:1<238::AID-CNCR31>3.0.CO;2-F.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(20000101\)88:1<238::AID-CNCR31>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(20000101)88:1<238::AID-CNCR31>3.0.CO;2-F)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618628>
41. Ross,J.S. and McKenna,B.J. (2001) The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest.*, 10.1081/CNV-100103852.
<https://doi.org/10.1081/CNV-100103852>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458821>
42. Yu,J., Miehlke,S., Ebert,M.P.A., Szokodi,D., Wehvnignh,B., Malf  rtheiner,P., Ehninger,G. and Bayerdoerffer,E. (2002) Expression of cyclin genes in human gastric cancer and in first degree relatives. *Chin. Med. J. (Engl)*.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12133540>
43. Kozma,L., Kiss,I., Hajd  ,J., Szentkereszty,Z., Szak  ll,S. and Ember,I. (2001) C-myc amplification and cluster analysis in human gastric carcinoma. *Anticancer Res*.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11299830>
44. Allgayer,H., Babic,R., Gruetzner,K.U., Tarabichi,A., Schildberg,F.W. and Heiss,M.M. (2000) c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J. Clin. Oncol.*, 10.1200/JCO.2000.18.11.2201.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.11.2201>

45. Miyachi,K., Fujita,M., Tanaka,N., Sasaki,K. and Sunagawa,M. (2002) Correlation between telomerase activity and telomeric-repeat binding factors in gastric cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12148588>

46. Yang,S.M., Fang,D.C., Luo,Y.H., Lu,R., Battle,P.D. and Liu,W.W. (2001) Alterations of telomerase activity and terminal restriction fragment in gastric cancer and its premalignant lesions. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 10.1046/j.1440-1746.2001.02540.x.
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2001.02540.x>

47. Krupp,G., Bonatz,G. and Parwaresch,R. (2000) Telomerase, immortality and cancer. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 10.1016/S1387-2656(00)06020-8.
[https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(00\)06020-8](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(00)06020-8)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11193292>

48. Kakeji,Y. (2001) Gastric cancer with high telomerase activity shows rapid development and invasiveness. *Oncol. Rep.*, 10.3892/or.8.1.107.
<https://doi.org/10.3892/or.8.1.107>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11115579>

49. Lee,J., Seo,J.W., Jun,H.J., Ki,C.S., Park,S.H., Park,Y.S., Lim,H.Y., Choi,M.G., Bae,J.M., Sohn,T.S., *et al.* (2011) Impact of MET amplification on gastric cancer: Possible roles as a novel prognostic marker and a potential therapeutic target. *Oncol. Rep.*, 10.3892/or.2011.1219.
<https://doi.org/10.3892/or.2011.1219>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21424128>

50. Toyokawa,T., Yashiro,M. and Hirakawa,K. (2009) Co-expression of keratinocyte growth factor and K-sam is an independent prognostic factor in gastric carcinoma. *Oncol. Rep.*, 10.3892/or_00000297.
https://doi.org/10.3892/or_00000297
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287982>

51. Gravalos,C. and Jimeno,A. (2008) HER2 in gastric cancer: A new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann. Oncol.*, 10.1093/annonc/mdn169.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdn169>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18441328>

52. Grabsch,H., Sivakumar,S., Gray,S., Gabbert,H.E. and Müller,W. (2010) HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value-conclusions from 924 cases of two independent series. *Cell. Oncol.*, 10.3233/CLO-2009-0497.
<https://doi.org/10.3233/CLO-2009-0497>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20208134>

53. Wu,M., Semba,S., Oue,N., Ikehara,N., Yasui,W. and Yokozaki,H. (2004) BRAF/K-ras mutation, microsatellite instability, and promoter hypermethylation of hMLH1/MGMT in human gastric carcinomas. *Gastric Cancer*, 10.1007/s10120-004-0300-9.
<https://doi.org/10.1007/s10120-004-0300-9>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616773>

54. Corso,G., Velho,S., Paredes,J., Pedrazzani,C., Martins,D., Milanezi,F., Pascale,V., Vindigni,C., Pinheiro,H., Leite,M., *et al.* (2011) Oncogenic mutations in gastric cancer

with microsatellite instability. *Eur. J. Cancer*, 10.1016/j.ejca.2010.09.008.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.09.008>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20937558>

55. Tan, I.B., Ivanova, T., Lim, K.H., Ong, C.W., Deng, N., Lee, J., Tan, S.H., Wu, J., Lee, M.H., Ooi, C.H., *et al.* (2011) Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy. *Gastroenterology*, 10.1053/j.gastro.2011.04.042.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.042>

56. Wu, Y., Grabsch, H., Ivanova, T., Tan, I.B., Murray, J., Ooi, C.H., Wright, A.I., West, N.P., Hutchins, G.G.A., Wu, J., *et al.* (2013) Comprehensive genomic meta-analysis identifies intra-tumoural stroma as a predictor of survival in patients with gastric cancer. *Gut*, 10.1136/gutjnl-2011-301373.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301373>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22735568>

57. Deng, N., Goh, L.K., Wang, H., Das, K., Tao, J., Tan, I.B., Zhang, S., Lee, M., Wu, J., Lim, K.H., *et al.* (2012) A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut*, 10.1136/gutjnl-2011-301839.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301839>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22315472>

58. Dulak, A.M., Schumacher, S.E., Van Lieshout, J., Imamura, Y., Fox, C., Shim, B., Ramos, A.H., Saksena, G., Baca, S.C., Baselga, J., *et al.* (2012) Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis. *Cancer Res.*, 10.1158/0008-5472.CAN-11-3893.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3893>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22751462>

59. Nadauld, L.D. and Ford, J.M. (2013) Molecular profiling of gastric cancer: Toward personalized cancer medicine. *J. Clin. Oncol.*, 10.1200/JCO.2012.47.1714.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.1714>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23341521>

60. Hye, S.L., Cho, S.B., Hee, E.L., Kim, M.A., Ji, H.K., Do, J.P., Ju, H.K., Yang, H.K., Byung, L.L. and Woo, H.K. (2007) Protein expression profiling and molecular classification of gastric cancer by the tissue array method. *Clin. Cancer Res.*, 10.1158/1078-0432.CCR-07-0173.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0173>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17634543>

61. Bass, A.J., Thorsson, V., Shmulevich, I., Reynolds, S.M., Miller, M., Bernard, B., Hinoue, T., Laird, P.W., Curtis, C., Shen, H., *et al.* (2014) Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 10.1038/nature13480.
<https://doi.org/10.1038/nature13480>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25079317>

62. Razzak, M. (2014) New molecular classification of gastric adenocarcinoma proposed by The Cancer Genome Atlas. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*,

10.1038/nrgastro.2014.146.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.146>

63. Kim,J.Y., Shin,N.R., Kim,A., Lee,H.J., Park,W. young, Kim,J.Y., Lee,C.H., Huh,G.Y. and Park,D.Y. (2013) Microsatellite instability status in gastric cancer: A reappraisal of its clinical significance and relationship with mucin phenotypes. *Korean J. Pathol.*, 10.4132/KoreanJPathol.2013.47.1.28.
<https://doi.org/10.4132/KoreanJPathol.2013.47.1.28>

64. Choi,Y.Y., Bae,J.M., An,J.Y., Kwon,I.G., Cho,I., Shin,H.B., Eiji,T., Aburahmah,M., Kim,H. Il, Cheong,J.H., *et al.* (2014) Is microsatellite instability a prognostic marker in gastric cancer?: A systematic review with meta-analysis. *J. Surg. Oncol.*, 10.1002/jso.23618.
<https://doi.org/10.1002/jso.23618>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24737677>

65. Falchetti,M., Saieva,C., Lupi,R., Masala,G., Rizzolo,P., Zanna,I., Ceccarelli,K., Sera,F., Mariani-Costantini,R., Nesi,G., *et al.* (2008) Gastric cancer with high-level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival. *Hum. Pathol.*, 10.1016/j.humpath.2007.10.024.
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.10.024>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18440592>

66. Gazvoda,B., Juvan,R., Zupanič-Pajnič,I., Repše,S., Ferlan-Marolt,K., Balažič,J. and Komel,R. (2007) Genetic changes in Slovenian patients with gastric adenocarcinoma evaluated in terms of microsatellite DNA. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 10.1097/MEG.0b013e3282f13cf9.
<https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3282f13cf9>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17998833>

67. Karaman,A., Eşrefkabalar,M., Nasir Binic,D., Öztürk,C. and Pirim,I. (2010) Genetic alterations in gastric precancerous lesions. *Genet. Couns.*
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21290973>

68. French,A.J., Petroni,G., Thibideau,S.N., Smolkin,M., Bissonette,E., Roviello,F., Harper,J.C., Koch,B.R., Anderson,S.A., Hebbbring,S.J., *et al.* (2004) Allelic imbalance of 8p indicates poor survival in gastric cancer. *J. Mol. Diagnostics*, 10.1016/S1525-1578(10)60517-X.
[https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60517-X](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60517-X)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15269302>

69. McLean,M.H. and El-Omar,E.M. (2014) Genetics of gastric cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 10.1038/nrgastro.2014.143.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.143>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25134511>

70. Ayed-Guerfali,D. Ben, Hassairi,B., Khabir,A., Sellami-Boudawara,T., Gargouri,A. and Mokdad-Gargouri,R. (2014) Expression of APC, β -catenin and E-cadherin in Tunisian patients with gastric adenocarcinoma: Clinical significance. *Tumor Biol.*, 10.1007/s13277-013-1236-7.

<https://doi.org/10.1007/s13277-013-1236-7>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24197976>

71. Humar,B. and Guilford,P. (2009) Hereditary diffuse gastric cancer: A manifestation of lost cell polarity. *Cancer Sci.*, 10.1111/j.1349-7006.2009.01163.x.
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01163.x>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19432899>

72. Lin,M.T., Lin,B.R., Chang,C.C., Chu,C.Y., Su,H.J., Chen,S.T., Jeng,Y.M. and Kuo,M.L. (2007) IL-6 induces AGS gastric cancer cell invasion via activation of the c-Src/RhoA/ROCK signaling pathway. *Int. J. Cancer*, 10.1002/ijc.22599.
<https://doi.org/10.1002/ijc.22599>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17304514>

73. Murray,D., Horgan,G., MacMathuna,P. and Doran,P. (2008) NET1-mediated RhoA activation facilitates lysophosphatidic acid-induced cell migration and invasion in gastric cancer. *Br. J. Cancer*, 10.1038/sj.bjc.6604688.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604688>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18827818>

74. Liu,N., Bi,F., Pan,Y., Sun,L., Xue,V., Shi,Y., Yao,X., Zheng,Y. and Fan,D. (2004) Reversal of the malignant phenotype of gastric cancer cells by inhibition of RhoA expression and activity. *Clin. Cancer Res.*, 10.1158/1078-0432.CCR-04-0242.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0242>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15448013>

75. Constanza Camargo,M., Kim,W.H., Chiaravalli,A.M., Kim,K.M., Corvalan,A.H., Matsuo,K., Yu,J., Sung,J.J.Y., Herrera-Goepfert,R., Meneses-Gonzalez,F., *et al.* (2014) Improved survival of gastric cancer with tumour Epstein-Barr virus positivity: An international pooled analysis. *Gut*, 10.1136/gutjnl-2013-304531.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304531>

76. Kandoth,C., McLellan,M.D., Vandin,F., Ye,K., Niu,B., Lu,C., Xie,M., Zhang,Q., McMichael,J.F., Wyczalkowski,M.A., *et al.* (2013) Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 10.1038/nature12634.
<https://doi.org/10.1038/nature12634>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24132290>

77. González,C.A., Sala,N. and Capellá,G. (2002) Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int. J. Cancer*, 10.1002/ijc.10466.
<https://doi.org/10.1002/ijc.10466>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12115538>

78. El-Omar,E.M., Carrington,M., Chow,W.H., McColl,K.E.L., Bream,J.H., Young,H.A., Herrera,J., Lissowska,J., Yuan,C.C., Rothman,N., *et al.* (2000) Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, 10.1038/35006081.
<https://doi.org/10.1038/35006081>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10746728>

79. El-Omar,E.M., Rabkin,C.S., Gammon,M.D., Vaughan,T.L., Risch,H.A., Schoenberg,J.B., Stanford,J.L., Mayne,S.T., Goedert,J., Blot,W.J., *et al.* (2003) Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*, 10.1016/S0016-5085(03)00157-4.
[https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00157-4](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00157-4)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730860>
80. Garza-González,E., Bosques-Padilla,F.J., El-Omar,E., Hold,G., Tijerina-Menchaca,R., Maldonado-Garza,H.J. and Pérez-Pérez,G.I. (2005) Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int. J. Cancer*, 10.1002/ijc.20718.
<https://doi.org/10.1002/ijc.20718>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15540224>
81. Machado,J.C., Pharoah,P., Sousa,S., Carvalho,R., Oliveira,C., Figueiredo,C., Amorim,A., Seruca,R., Caldas,C., Carneiro,F., *et al.* (2001) Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 10.1053/gast.2001.28000.
<https://doi.org/10.1053/gast.2001.28000>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606496>
82. García-González,M.A., Lanas,A., Quintero,E., Nicolás,D., Parra-Blanco,A., Strunk,M., Benito,R., Angel Simón,M., Santolaria,S., Sopeña,F., *et al.* (2007) Gastric cancer susceptibility is not linked to pro-and anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms in whites: A nationwide multicenter study in Spain. *Am. J. Gastroenterol.*, 10.1111/j.1572-0241.2007.01423.x.
<https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01423.x>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17640324>
83. Monie,T.P., Hold,G.L. and Mukhopadhyay,I. (2011) Innate immune sensors and gastrointestinal bacterial infections. *Clin. Dev. Immunol.*, 10.1155/2011/579650.
<https://doi.org/10.1155/2011/579650>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21647408>
84. Hold,G.L., Rabkin,C.S., Chow,W.H., Smith,M.G., Gammon,M.D., Risch,H.A., Vaughan,T.L., McColl,K.E.L., Lissowska,J., Zatonski,W., *et al.* (2007) A Functional Polymorphism of Toll-Like Receptor 4 Gene Increases Risk of Gastric Carcinoma and Its Precursors. *Gastroenterology*, 10.1053/j.gastro.2006.12.026.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.12.026>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17324405>
85. Castaño-Rodríguez,N., Kaakoush,N.O., Goh,K.L., Fock,K.M. and Mitchell,H.M. (2013) The Role of TLR2, TLR4 and CD14 Genetic Polymorphisms in Gastric Carcinogenesis: A Case-Control Study and Meta-Analysis. *PLoS One*, 10.1371/journal.pone.0060327.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060327>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23565226>
86. Zhang,K., Zhou,B., Wang,Y., Rao,L. and Zhang,L. (2013) The TLR4 gene polymorphisms and susceptibility to cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Cancer*, 10.1016/j.ejca.2012.09.022.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.09.022>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23084080>

87. Zhang,Y., Liu,C., Peng,H., Zhang,J. and Feng,Q. (2012) IL1 Receptor Antagonist Gene IL1-RN Variable Number of Tandem Repeats Polymorphism and Cancer Risk: A Literature Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 10.1371/journal.pone.0046017.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046017>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23049925>
88. Xu,J., Yin,Z., Cao,S., Gao,W., Liu,L., Yin,Y., Liu,P. and Shu,Y. (2013) Systematic Review and Meta-Analysis on the Association between IL-1B Polymorphisms and Cancer Risk. *PLoS One*, 10.1371/journal.pone.0063654.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063654>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23704929>
89. Gorouhi,F., Islami,F., Bahrami,H. and Kamangar,F. (2008) Tumour-necrosis factor-A polymorphisms and gastric cancer risk: A meta-analysis. *Br. J. Cancer*, 10.1038/sj.bjc.6604277.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604277>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18319718>
90. Zhang,J., Dou,C., Song,Y., Ji,C., Gu,S., Xie,Y. and Mao,Y. (2008) Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha are associated with increased susceptibility to gastric cancer: A meta-analysis. *J. Hum. Genet.*, 10.1007/s10038-008-0273-3.
<https://doi.org/10.1007/s10038-008-0273-3>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18350251>
91. Hong,Y., Ge,Z., Jing,C., Shi,J., Dong,X., Zhou,F., Wang,M., Zhang,Z. and Gong,W. (2013) Functional Promoter -308G>A Variant in Tumor Necrosis Factor α Gene Is Associated with Risk and Progression of Gastric Cancer in a Chinese Population. *PLoS One*, 10.1371/journal.pone.0050856.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050856>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23326309>
92. Junli,W., Wenjun,H., Jinxin,L., Legen,N., Yesheng,W. and Fenglian,Y. (2012) Association of IL-6 polymorphisms with gastric cancer risk: Evidences from a meta-analysis. *Cytokine*, 10.1016/j.cyto.2012.03.032.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.03.032>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554382>
93. Yin,Y.W., Sun,Q.Q., Hu,A.M., Wang,Q., Liu,H.L., Hou,Z.Z., Zeng,Y.H., Xu,R.J., Shi,L.B. and Ma,J. Bin (2012) Associations between interleukin-6 gene -174 C/G and -572 C/G polymorphisms and the risk of gastric cancer: A meta-analysis. *J. Surg. Oncol.*, 10.1002/jso.23199.
<https://doi.org/10.1002/jso.23199>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22711691>
94. Ni,P., Xu,H., Xue,H., Lin,B. and Lu,Y. (2012) A meta-analysis of interleukin-10-1082 promoter polymorphism associated with gastric cancer risk. *DNA Cell Biol.*, 10.1089/dna.2011.1440.
<https://doi.org/10.1089/dna.2011.1440>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22335769>
95. Pan,F., Tian,J., Pan,Y.Y. and Zhang,Y. (2012) Association of IL-10-1082 promoter polymorphism with susceptibility to gastric cancer: Evidence from 22 case-control studies.

Mol. Biol. Rep., 10.1007/s11033-012-1546-7.
<https://doi.org/10.1007/s11033-012-1546-7>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22311038>

96. Xue,H., Lin,B., An,J., Zhu,Y. and Huang,G. (2012) Interleukin-10-819 promoter polymorphism in association with gastric cancer risk. *BMC Cancer*, 10.1186/1471-2407-12-102.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-102>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22436502>

97. Li,K., Xia,F., Zhang,K., Mo,A. and Liu,L. (2013) Association of a Tgf-B1-509c/T Polymorphism with Gastric Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Ann. Hum. Genet.*, 10.1111/j.1469-1809.2012.00732.x.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2012.00732.x>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23088218>

98. Niu,H., Niu,Z., Zhang,X.L. and Chen,Z.L. (2012) Absence of association between transforming growth factor B1 polymorphisms and gastric cancer: A meta-analysis. *DNA Cell Biol.*, 10.1089/dna.2011.1426.
<https://doi.org/10.1089/dna.2011.1426>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22074128>

99. Zhang,C.F., Wang,Z.W., Hou,M.X., Li,K., Zhou,X. and Xia,Y.H. (2012) Transforming Growth Factor β 1-509C/T and +869T/C Polymorphisms on the Risk of Upper Digestive Tract Cancer: A Meta-Analysis Based on 10,917 Participants. *Ann. Hum. Genet.*, 10.1111/j.1469-1809.2012.00717.x.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2012.00717.x>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22724518>

100. Matveeva,L. V. and Mosina,L.M. (2012) The role of interleukin-1 and associated cytokines in gastric carcinogenesis. *Vestn. Ross. Akad. Meditsinskikh Nauk*, 10.15690/vramn.v67i11.473.
<https://doi.org/10.15690/vramn.v67i11.473>

101. Li,K., Yang,J. and Chen,Z.R. (2010) Relationships among interleukin-1 β , interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and susceptibility to gastric cancer. *J. Sichuan Univ. (Medical Sci. Ed.*
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21265111>

102. Yu,J., Jia,Y., Cheung,K.F., Zeng,Z., Tian,L., Wang,S., Hu,P. and Sung,J.J.Y. (2011) Polymorphisms in interleukin-6-6331 influences the susceptibility of a chinese population to gastric cancer. *Cancer Invest.*, 10.3109/07357907.2011.605411.
<https://doi.org/10.3109/07357907.2011.605411>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21843047>

103. Xue,H., Wang,Y.-C., Lin,B., An,J., Chen,L., Chen,J. and Fang,J.-Y. (2012) A Meta-Analysis of Interleukin-10 -592 Promoter Polymorphism Associated with Gastric Cancer Risk. *PLoS One*, 10.1371/journal.pone.0039868.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039868>

104. Zeng,X., Li,Y., Liu,T. and Zhang,J. (2012) Diverse H. pylori strains, IL-10 promoter

polymorphisms with high morbidity of gastric cancer in Hexi area of Gansu Province, China. *Mol. Cell. Biochem.*, 10.1007/s11010-011-1149-y.
<https://doi.org/10.1007/s11010-011-1149-y>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22081333>

105. Ando,T., Ishikawa,T., Kato,H., Yoshida,N., Naito,Y., Kokura,S., Yagi,N., Takagi,T., Handa,O., Kitawaki,J., *et al.* (2009) Synergistic effect of HLA class II loci and cytokine gene polymorphisms on the risk of gastric cancer in Japanese patients with *Helicobacter pylori* infection. *Int. J. Cancer*, 10.1002/ijc.24666.
<https://doi.org/10.1002/ijc.24666>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19544559>

106. Huang,L.M., Cheng,Y., Yu,D.K., Zhai,K., Tan,W. and Lin,D.X. (2012) Association between HLA-DQA1 gene copy number polymorphisms and susceptibility to gastric cancer. *Chinese J. Oncol.*, 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2012.04.007.
<https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2012.04.007>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22781038>

107. Wang,J. and El-Bahrawy,M. (2015) Expression profile of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) in ovarian mucinous tumours: Changes in expression from benign to malignant tumours. *Histopathology*, 10.1111/his.12578.
<https://doi.org/10.1111/his.12578>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25298197>

108. Nath,S. and Mukherjee,P. (2014) MUC1: A multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol. Med.*, 10.1016/j.molmed.2014.02.007.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.02.007>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24667139>

109. Liu,X., Wang,Z., Zhang,X., Chang,J., Tang,W., Gan,L., Wu,Z. and Li,J. (2014) MUC1 gene polymorphism rs4072037 and susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis. *Springerplus*, 10.1186/2193-1801-3-599.
<https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-599>

110. Jensen,P., Heimberg,M., Ducray,A.D., Widmer,H.R. and Meyer,M. (2013) Expression of Trefoil Factor 1 in the Developing and Adult Rat Ventral Mesencephalon. *PLoS One*, 10.1371/journal.pone.0076592.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076592>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24116124>

111. Yang,X.N., Lu,Y.P., Liu,J.J., Huang,J.K., Liu,Y.P., Xiao,C.X., Jazag,A., Ren,J.L. and Guleng,B. (2014) Piezo1 is as a novel trefoil factor family 1 binding protein that promotes gastric cancer cell mobility in vitro. *Dig. Dis. Sci.*, 10.1007/s10620-014-3044-3.
<https://doi.org/10.1007/s10620-014-3044-3>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798994>

112. Dos Santos Silva,E., Kayademir,T., Regateiro,F., Machado,J.C., Savas,S., Dobosz,T., Blin,N. and Gött,P. (1999) Variable distribution of TFF2 (Spasmodysin) alleles in Europeans does not indicate predisposition to gastric cancer. *Hum. Hered.*, 10.1159/000022839.
<https://doi.org/10.1159/000022839>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858857>

113. Dong,L.M., Potter,J.D., White,E., Ulrich,C.M., Cardon,L.R. and Peters,U. (2008) Genetic susceptibility to cancer: The role of polymorphisms in candidate genes. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, 10.1001/jama.299.20.2423.
<https://doi.org/10.1001/jama.299.20.2423>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18505952>
114. Meng,X., Liu,Y. and Liu,B. (2014) Glutathione S-transferase M1 null genotype meta-analysis on gastric cancer risk. *Diagn. Pathol.*, 10.1186/1746-1596-9-122.
<https://doi.org/10.1186/1746-1596-9-122>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24948179>
115. Xue,H., Lu,Y., Xue,Z., Lin,B., Chen,J., Tang,F. and Huang,G. (2014) The effect of CYP1A1 and CYP1A2 polymorphisms on gastric cancer risk among different ethnicities: A systematic review and meta-analysis. *Tumor Biol.*, 10.1007/s13277-014-1620-y.
<https://doi.org/10.1007/s13277-014-1620-y>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24443269>
116. Lao,X., Peng,Q., Lu,Y., Li,S., Qin,X., Chen,Z. and Chen,J. (2014) Glutathione S-transferase gene GSTM1, gene-gene interaction, and gastric cancer susceptibility: Evidence from an updated meta-analysis. *Cancer Cell Int.*, 10.1186/s12935-014-0127-3.
<https://doi.org/10.1186/s12935-014-0127-3>
117. Zhao,F., Cao,Y., Zhu,H., Huang,M., Yi,C. and Huang,Y. (2014) The -765G>C polymorphism in the cyclooxygenase-2 gene and digestive system cancer: A meta-analysis. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, **15**, 8301–8310.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.19.8301>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339021>
118. Han,L., Lee,S.W., Yoon,J.H., Park,Y.G., Choi,Y.J., Nam,S.W., Lee,J.Y., Wang,Y.P. and Park,W.S. (2013) Association of SOD1 and SOD2 single nucleotide polymorphisms with susceptibility to gastric cancer in a Korean population. *APMIS*, 10.1111/j.1600-0463.2012.02963.x.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02963.x>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23030347>
119. Auerbeck,N.B., Ringel,O., Herrlitz,M., Jakob,B., Durante,M. and Taucher-Scholz,G. (2014) DNA end resection is needed for the repair of complex lesions in G1-phase human cells. *Cell Cycle*, 10.4161/15384101.2015.941743.
<https://doi.org/10.4161/15384101.2015.941743>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25486192>
120. Dong,X., Wu,J., Liang,P., Li,J., Yuan,L. and Liu,X. (2010) Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms and Gastric Cancer: A Meta-analysis. *Arch. Med. Res.*, 10.1016/j.arcmed.2010.01.001.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2010.01.001>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20470942>
121. Liu,B.M., Liu,T.M., You,B.S., You,H.Y., Yang,J., Li,L. and He,Y.C. (2012) Lack of an association between the XRCC1 Arg399Gln polymorphism and gastric cancer based on a meta-analysis. *Genet. Mol. Res.*, 10.4238/2012.November.12.2.
<https://doi.org/10.4238/2012.November.12.2>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23212324>

122. Pan,X.F., Xie,Y., Loh,M., Yang,S.J., Wen,Y.Y., Tian,Z., Huang,H., Lan,H., Chen,F., Soong,R., *et al.* (2012) Polymorphisms of XRCC1 and ADPRT genes and risk of noncardia gastric cancer in a Chinese population: A casecontrol study. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 10.7314/APJCP.2012.13.11.5637.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.11.5637>
123. Malakar,M., Devi,K.R., Phukan,R.K., Kaur,T., Deka,M., Puia,L., Sailo,L., Lalmangaihi,T., Barua,D., Rajguru,S.K., *et al.* (2014) p53 codon 72 polymorphism interactions with dietary and tobacco related habits and risk of stomach cancer in Mizoram, India. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 10.7314/APJCP.2014.15.2.717.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.2.717>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24568485>
124. Zhang,Q., Ma,Y.Y., Wang,H.J., Shao,C.M., Zhang,J. and Ye,Z.Y. (2013) Meta-analysis of the association between P53 codon 72 polymorphisms and gastric cancer. *J. Surg. Oncol.*, 10.1002/jso.23233.
<https://doi.org/10.1002/jso.23233>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22886602>
125. Steeg,P.S. (2006) Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges. *Nat. Med.*, 10.1038/nm1469.
<https://doi.org/10.1038/nm1469>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16892035>
126. Kushlinskii,N.E., Delektorskaya,V. V., Mochal'nikova,V. V., Sini,L., Yurchenko,A.A., Ryabov,A.B. and Stilidi,I.S. (2008) Analysis of NM23 protein and components of plasminogen activation system in tumors of patients with stomach cancer with consideration for disease clinical picture and morphology. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 10.1007/s10517-009-0421-6.
<https://doi.org/10.1007/s10517-009-0421-6>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19513384>
127. Zhou,L.P., Luan,H., Dong,X.H., Jin,G.J., Man,D.L. and Shang,H. (2011) Vascular endothelial growth factor +936C/T polymorphism and gastric cancer risk: A meta-analysis. *Exp. Ther. Med.*, 10.3892/etm.2011.278.
<https://doi.org/10.3892/etm.2011.278>
128. Kishida,K., Funahashi,T. and Shimomura,I. (2014) Adiponectin as a routine clinical biomarker. In *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*.
<https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.08.006>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24417951>
129. Camargo,M.C., Mera,R., Correa,P., Peek,R.M., Fontham,E.T.H., Goodman,K.J., Piazuelo,M.B., Sicinski,L., Zabaleta,J. and Schneider,B.G. (2006) Interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and gastric cancer: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10.1158/1055-9965.EPI-06-0189.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0189>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16985030>
130. Xue,H., Lin,B., Ni,P., Xu,H. and Huang,G. (2010) Interleukin-1B and interleukin-1 RN polymorphisms and gastric carcinoma risk: A meta-analysis. *J. Gastroenterol.*

Hepatol., 10.1111/j.1440-1746.2010.06428.x.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06428.x>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880168>

131. Kamangar,F., Cheng,C., Abnet,C.C. and Rabkin,C.S. (2006) Interleukin-1B polymorphisms and gastric cancer risk - A meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10.1158/1055-9965.EPI-06-0267.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0267>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17035400>

132. al-Moundhri,M.S., al-Khanbashi,M., al-Kindi,M., al-Nabhani,M., Burney,I.A., al-Farsi,A. and al-Bahrani,B. (2010) Association of e-cadherin (CDH1) gene polymorphisms and gastric cancer risk. *World J. Gastroenterol.*, 10.3748/wjg.v16.i27.3432.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i27.3432>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20632448>

133. Corso,G., Berardi,A., Marrelli,D., Pedrazzani,C., Garosi,L., Pinto,E. and Roviello,F. (2009) CDH1 C-160A promoter polymorphism and gastric cancer risk. *Eur. J. Cancer Prev.*, 10.1097/CEJ.0b013e32830c8d70.
<https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e32830c8d70>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19077564>

134. Jiang,B., Zhu,K., Shao,H., Bao,C., Ou,J. and Sun,W. (2015) Lack of association between the CDH1 polymorphism and gastric cancer susceptibility: A meta-analysis. *Sci. Rep.*, 10.1038/srep07891.
<https://doi.org/10.1038/srep07891>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25599647>

135. Wiley,S.R., Schooley,K., Smolak,P.J., Din,W.S., Huang,C.P., Nicholl,J.K., Sutherland,G.R., Smith,T.D., Rauch,C., Smith,C.A., *et al.* (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 10.1016/1074-7613(95)90057-8.
[https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90057-8](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90057-8)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8777713>

136. Walczak,H., Degli-Esposti,M.A., Johnson,R.S., Smolak,P.J., Waugh,J.Y., Boiani,N., Timour,M.S., Gerhart,M.J., Schooley,K.A., Smith,C.A., *et al.* (1997) TRAIL-R2: A novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.*, 10.1093/emboj/16.17.5386.
<https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5386>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9311998>

137. Zamai,L., Ahmad,M., Bennett,I.M., Azzoni,L., Alnemri,E.S. and Perussia,B. (1998) Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: Differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.*, 10.1084/jem.188.12.2375.
<https://doi.org/10.1084/jem.188.12.2375>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858524>

138. Pan,G., Ni,J., Wei,Y.F., Yu,G.I., Gentz,R. and Dixit,V.M. (1997) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science (80-.)*, 10.1126/science.277.5327.815.
<https://doi.org/10.1126/science.277.5327.815>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9242610>

139. Degli-Esposti, M.A., Smolak, P.J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C.P., DuBose, R.F., Goodwin, R.G. and Smith, C.A. (1997) Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.*, 10.1084/jem.186.7.1165.
<https://doi.org/10.1084/jem.186.7.1165>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9314565>
140. Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D. and Ashkenazi, A. (2001) Death Receptor Recruitment of Endogenous Caspase-10 and Apoptosis Initiation in the Absence of Caspase-8. *J. Biol. Chem.*, 10.1074/jbc.M105102200.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M105102200>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583996>
141. Wang, J., Chun, H.J., Wong, W., Spencer, D.M. and Lenardo, M.J. (2001) Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 10.1073/pnas.241358198.
<https://doi.org/10.1073/pnas.241358198>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717445>
142. Sprick, M.R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M.A. and Walczak, H. (2002) Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.*, 10.1093/emboj/cdf441.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdf441>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12198154>
143. Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C. and Grütter, M.G. (2002) The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.*, 10.1074/jbc.M206882200.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M206882200>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12215447>
144. Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 10.1016/S0092-8674(00)81590-1.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81590-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81590-1)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727492>
145. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 10.1016/S0092-8674(00)81589-5.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81589-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81589-5)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727491>
146. Maas, C., Verbrugge, I., De Vries, E., Savich, G., Van De Kooij, L.W., Tait, S.W.G. and Borst, J. (2010) Smac/DIABLO release from mitochondria and XIAP inhibition are essential to limit clonogenicity of Type i tumor cells after TRAIL receptor stimulation. *Cell Death Differ.*, 10.1038/cdd.2010.39.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2010.39>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20395960>

147. Jost,P.J., Grabow,S., Gray,D., McKenzie,M.D., Nachbur,U., Huang,D.C.S., Bouillet,P., Thomas,H.E., Borner,C., Silke,J., *et al.* (2009) XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*, 10.1038/nature08229.
<https://doi.org/10.1038/nature08229>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19626005>
148. Cretney,E., Takeda,K., Yagita,H., Glaccum,M., Peschon,J.J. and Smyth,M.J. (2002) Increased Susceptibility to Tumor Initiation and Metastasis in TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Deficient Mice. *J. Immunol.*, 10.4049/jimmunol.168.3.1356.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.3.1356>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801676>
149. Wang,Q., Ji,Y., Wang,X. and Evers,B.M. (2000) Isolation and molecular characterization of the 5'-upstream region of the human TRAIL gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10.1006/bbrc.2000.3512.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3512>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11027498>
150. Kim,K.B., Choi,Y.H., Kim,I.K., Chung,C.W., Kim,B.J., Park,Y.M. and Jung,Y.K. (2002) Potentiation of Fas- and trail-mediated apoptosis by IFN- γ in A549 lung epithelial cells: Enhancement of caspase-8 expression through IFN-response element. *Cytokine*, 10.1006/cyto.2003.2008.
<https://doi.org/10.1006/cyto.2003.2008>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12633570>
151. Tu,Z., Hamalainen-Laanaya,H.K., Crispe,I.N. and Orloff,M.S. (2011) Synergy between TLR3 and IL-18 promotes IFN- γ dependent TRAIL expression in human liver NK cells. *Cell. Immunol.*, 10.1016/j.cellimm.2011.07.006.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.07.006>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21802664>
152. Kayagaki,N., Yamaguchi,N., Nakayama,M., Hiroshi,E., Okumura,K. and Yagita,H. (1999) Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J. Exp. Med.*, 10.1084/jem.189.9.1451.
<https://doi.org/10.1084/jem.189.9.1451>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10224285>
153. Yanase,N., Hata,K., Shimo,K., Hayashida,M., Evers,B.M. and Mizuguchi,J. (2005) Requirement of c-Jun NH2-terminal kinase activation in interferon- α -induced apoptosis through upregulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in Daudi B lymphoma cells. *Exp. Cell Res.*, 10.1016/j.yexcr.2005.06.021.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.06.021>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16099454>
154. Choi,E.A., Lei,H., Maron,D.J., Wilson,J.M., Barsoum,J., Fraker,D.L., El-Deiry,W.S. and Spitz,F.R. (2003) Stat1-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and the cell-surface death signaling pathway by interferon β in human cancer cells. *Cancer Res.*
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14500361>

155. Wang,Q., Zhou,Y., Weiss,H.L., Chow,C.W. and Evers,B.M. (2011) Nfatc1 regulation of trail expression in human intestinal cells. *PLoS One*, 10.1371/journal.pone.0019882.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019882>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21603612>
156. Chan,J., Prado-Lourenco,L., Khachigian,L.M., Bennett,M.R., Di Bartolo,B.A. and Kavurma,M.M. (2010) TRAIL promotes VSMC proliferation and neointima formation in a FGF-2-, Sp1 Phosphorylation-, and NFκB-Dependent Manner. *Circ. Res.*, 10.1161/CIRCRESAHA.109.206029.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.206029>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150555>
157. Baetu,T.M., Kwon,H., Sharma,S., Grandvaux,N. and Hiscott,J. (2001) Disruption of NF-κB Signaling Reveals a Novel Role for NF-κB in the Regulation of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Expression. *J. Immunol.*, 10.4049/jimmunol.167.6.3164.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.6.3164>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544302>
158. Su,Z., Xin,S., Xu,L., Cheng,J., Guo,J., Li,L. and Wei,Q. (2012) The calcineurin B subunit induces TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression via CD11b-NF-κB pathway in RAW264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10.1016/j.bbrc.2011.12.034.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.034>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22197822>
159. Kuribayashi,K., Krigsfeld,G., Wang,W., Xu,J., Mayes,P.A., Dicker,D.T., Gen,S.W. and El-Deiry,W.S. (2008) TNFSF10 (TRAIL), a p53 target gene that mediates p53-dependent cell death. *Cancer Biol. Ther.*, 10.4161/cbt.7.12.7460.
<https://doi.org/10.4161/cbt.7.12.7460>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19106633>
160. Unnithan,J. and Macklis,R.M. (2004) TRAIL induction by radiation in lymphoma patients. *Cancer Invest.*, 10.1081/CNV-200026397.
<https://doi.org/10.1081/CNV-200026397>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15565809>
161. Modur,V., Nagarajan,R., Evers,B.M. and Milbrandt,J. (2002) FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression: Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J. Biol. Chem.*, 10.1074/jbc.M207509200.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M207509200>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12351634>
162. Hirose,T., Sowa,Y., Takahashi,S., Saito,S., Yasuda,C., Shindo,N., Furuichi,K. and Sakai,T. (2003) p53-independent induction of Gadd45 by histone deacetylase inhibitor: Coordinate regulation by transcription factors Oct-1 and NF-Y. *Oncogene*, 10.1038/sj.onc.1207091.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207091>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14586402>
163. Özören,N. and El-Deiry,W. (2002) Heat shock protects HCT116 and H460 cells from

TRAIL-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 10.1006/excr.2002.5660.
<https://doi.org/10.1006/excr.2002.5660>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460647>

164. Forrester,K., Allmoguera,C., Perucho,M., Han,K. and Grizzle,W.E. (1987) Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature*, 10.1038/327298a0.
<https://doi.org/10.1038/327298a0>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2438556>

165. Bos,J.L., Vries,M.V. de, Van Der Eb,A.J., Fearon,E.R., Vogelstein,B., Hamilton,S.R. and Van Boom,J.H. (1987) Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*, 10.1038/327293a0.
<https://doi.org/10.1038/327293a0>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3587348>

166. Koornstra,J.J., Kleibeuker,J.H., van Geelen,C.M.M., Rijcken,F.E.M., Hollema,H., de Vries,E.G.E. and de Jong,S. (2003) Expression of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) and its receptors in normal colonic mucosa, adenomas, and carcinomas. *J. Pathol.*, 10.1002/path.1364.
<https://doi.org/10.1002/path.1364>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12845629>

167. Ho,T.C., Chen,S.L., Shih,S.C., Chang,S.J., Yang,S.L., Hsieh,J.W., Cheng,H.C., Chen,L.J. and Tsao,Y.P. (2011) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) promotes tumor cell death by inducing macrophage membrane tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J. Biol. Chem.*, 10.1074/jbc.M111.266064.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.266064>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21846721>

168. Gong,B. and Almasan,A. (2000) Genomic organization and transcriptional regulation of human Apo2/TRAIL gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10.1006/bbrc.2000.3872.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3872>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11095979>

169. Woods,D.C., Alvarez,C. and Johnson,A.L. (2008) Cisplatin-mediated sensitivity to TRAIL-induced cell death in human granulosa tumor cells. *Gynecol. Oncol.*, 10.1016/j.ygyno.2007.11.034.
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.11.034>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18191995>

170. Wang,P., Lu,Y., Li,C., Li,N., Yu,P. and Ma,D. (2011) Novel transcript variants of TRAIL show different activities in activation of NF- κ B and apoptosis. *Life Sci.*, 10.1016/j.lfs.2011.09.003.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.09.003>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21952139>

171. Pal,R., Gochhait,S., Chattopadhyay,S., Gupta,P., Prakash,N., Agarwal,G., Chaturvedi,A., Husain,N., Husain,S.A. and Bamezai,R.N.K. (2011) Functional implication of TRAIL 2716 C/T promoter polymorphism on its in vitro and in vivo expression and the susceptibility to sporadic breast tumor. *Breast Cancer Res. Treat.*, 10.1007/s10549-010-0900-5.
<https://doi.org/10.1007/s10549-010-0900-5>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20443055>

173. Mohamed, Kandeel, S.H., Zaghlal, H.E., Osman, N.F., Helwa, M.A. and Bedier, H.M.. (2018) TRAIL receptor 1 polymorphism and cancer risk: a systematic review. *Menoufia Med. J.*, **31**, 730.
<https://doi.org/10.4103/1110-2098.248755>
174. Timirci-Kahraman, O., Ozkan, N.E., Turan, S., Farooqi, A.A., Verim, L., Ozturk, T., Inal-Gultekin, G., Isbir, T., Ozturk, O. and Yaylim, I. (2015) Genetic variants in the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and death receptor genes contribute to susceptibility to bladder cancer. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*, **19**, 309–315.
<https://doi.org/10.1089/gtmb.2015.0050>
175. Frank, B., Hemminki, K., Shanmugam, K.S., Meindl, A., Klaes, R., Schmutzler, R.K., Wappenschmidt, B., Untch, M., Bugert, P., Bartram, C.R., *et al.* (2005) Association of death receptor 4 haplotype 626C-683C with an increased breast cancer risk. *Carcinogenesis*, **26**, 10.1093/carcin/bgi164.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgi164>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15975957>
176. Hazra, A., Chamberlain, R.M., Grossman, H.B., Zhu, Y., Spitz, M.R. and Wu, X. (2003) Death receptor 4 and bladder cancer risk. *Cancer Res.* **63**, 2021–2025.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12649168>
177. Fisher, M.J., Virmani, A.K., Wu, L., Aplenc, R., Harper, J.C., Powell, S.M., Rebbeck, T.R., Sidransky, D., Gazdar, A.F. and El-Deiry, W.S. (2001) Nucleotide substitution in the ectodomain of TRAIL receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**, 1011–1018.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11410508>
178. Fernández, V., Jares, P., Beà, S., Salaverria, I., Guino, E., De Sanjosé, S., Colomer, D., Ott, G., Montserrat, E. and Campo, E. (2004) Frequent polymorphic changes but not mutations of TRAIL receptors DR4 and DR5 in mantle cell lymphoma and other B-cell lymphoid neoplasms. *Haematologica*, **89**, 1011–1018.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531454>
179. Koç Erbaşoğlu, Ö., Horozoğlu, C., Ercan, Ş., Kara, H.V., Turna, A., Farooqi, A.A. and Yaylim, İ. (2019) Effect of trail C1595T variant and gene expression on the pathogenesis of non-small cell lung cancer. *Libyan J. Med.*, **14**, 10.1080/19932820.2018.153574.
<https://doi.org/10.1080/19932820.2018.153574>
180. Yıldız Y, Yaylim İ, et al. Is there any correlation between TNF-related apoptosis inducing ligand genetic variants and breast cancer?.
181. Piras-Straub, K., Khairzada, K., Trippler, M., Baba, H.A., Kaiser, G.M., Paul, A., Canbay, A., Weber, F., Gerken, G. and Herzer, K. (2015) TRAIL expression levels in human hepatocellular carcinoma have implications for tumor growth, recurrence and survival. *Int. J. Cancer*, **116**, 10.1002/ijc.29139.
<https://doi.org/10.1002/ijc.29139>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25123818>

182. Taştemir-Korkmaz,D., Demirhan,O., Kuleci,S. and Hastürk,S. (2013) There is no significant association between death receptor 4 (dr4) gene polymorphisms and lung cancer in Turkish population. *Pathol. Oncol. Res.*, 10.1007/s12253-013-9643-z.
<https://doi.org/10.1007/s12253-013-9643-z>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23661154>

183. Chen,W., Tang,W.R., Zhang,M., Chang,K. and Wei,Y.L. (2014) Association of DR4 (TRAIL-R1) polymorphisms with cancer risk in Caucasians: An updated meta-analysis. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 10.7314/APJCP.2014.15.6.2889.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.6.2889>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24761920>

184. Horak,P., Pils,D., Roessler,M., Tomek,S., Elandt,K., Zeillinger,R., Zielinski,C. and Krainer,M. (2005) Common death receptor 4 (DR4) polymorphisms do not predispose to ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 10.1016/j.ygyno.2005.01.021.
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.01.021>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863153>

185. Dick,M.G., Versmold,B., Engel,C., Meindl,A., Arnold,N., Varon-Mateeva,R., Sutter,C., Niederacher,D., Deissler,H., Preisler-Adams,S., *et al.* (2012) Association of death receptor 4 variant (683A>C) with ovarian cancer risk in BRCA1 mutation carriers. *Int. J. Cancer*, 10.1002/ijc.26134.
<https://doi.org/10.1002/ijc.26134>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21484799>

186. Ulybina,Y.M., Kuligina,E.S., Mitiushkina,N. V., Rozanov,M.E., Ivantsov,A.O., Ponomariova,D.N., Togo,A. V., Levchenko,E. V., Shutkin,V.A., Brenister,S.I., *et al.* (2009) Coding polymorphisms in Casp5, Casp8 and DR4 genes may play a role in predisposition to lung cancer. *Cancer Lett.*, 10.1016/j.canlet.2009.01.012.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.01.012>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19203830>

187. Rai,R., Sharma,K.L., Sharma,S., Misra,S., Kumar,A. and Mittal,B. (2014) Death receptor (DR4) haplotypes are associated with increased susceptibility of gallbladder carcinoma in north indian population. *PLoS One*, 10.1371/journal.pone.0090264.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090264>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24587306>

188. Mittal,R.D., Srivastava,P., Mittal,T., Verma,A., Jaiswal,P.K., Singh,V., Mandal,R.K. and Mandhani,A. (2011) Association of death receptor 4, Caspase 3 and 5 gene polymorphism with increased risk to bladder cancer in North Indians. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 10.1016/j.ejso.2011.05.013.
<https://doi.org/10.1016/j.ejso.2011.05.013>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21700414>

189. Rehman,S.F., Mansoor,Q., Farooqi,A.A., Nazir,N., Kausar,R., Jabeen,N. and Ismail,M. (2016) Association between breast cancer and tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene 1595C/T SNP in a Pakistani population. *Wspolczesna Onkol.*, 10.5114/wo.2015.55421.
<https://doi.org/10.5114/wo.2015.55421>

190. Changgao Wang & Shufang Xu & Fengming Yi & Xiaobing Wang & Yuan Lei & Sha Huang & Rui Zhou & Bing Xia (2013). Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand Gene Polymorphisms are Correlated with Gastric Cancer in Central China. *Pharm Res.* DOI 10.1007/s11095-013-1217-y

191. Kazuya Kuraoka ¹, Shunji Matsumura, Yuichi Sanada, Kei Nakachi, Kazue Imai, Hidetaka Eguchi, Keisuke Matsusaki, Naohide Oue, Hirofumi Nakayama, Wataru Yasui. (2005) A single nucleotide polymorphism in the extracellular domain of TRAIL receptor DR4 at nucleotide 626 in gastric cancer patients in Japan. *Oncol Rep.* 2005 Aug; 14(2):465-70

192. Verim A, Turan S, Ammad F, Kahraman Timirci Ö, Karaca Tepe Ç. Association between Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and Polymorphisms in Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Induce Ligand (TRAIL), TRAIL Receptor and sTRAIL Levels. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (24), 10697-10703

193. Wei Chen, Wen-Ru Tang, Ming Zhang, Kwenjen Chang, Yun-Lin Wei. Association of DR4 (TRAIL-R1) Polymorphisms with Cancer Risk in Caucasians: an Updated Meta-analysis . *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (6), 2889-2892 .

194. Yaylın İ, Özkan NE, Turan S, Korkma G, Yıldız Y, Cacina C, Toptaş B, Arıkan S. sTRAIL Serum Levels and TRAIL 1595 Genotypes: Associations with Progress and Prognosis of Colorectal Carcinoma . *Journal of Cancer Therapy*, 2012, 3, 941-947

195. Kargi A, Bisgin A et al. Increased Serum sTRAIL Levels in Newly Diagnosed Stage IV lung Adenocarcinoma but not Squamous Cell Carcinoma is Correlated with Age and Smoking. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14 (8), 4819-4822

196. Atil Bisgin, Aysegul Kargi, Arzu D Yalcin, Cigdem Aydin, Deniz Ekinci, Burhan Savas and Salih Sanlioglu· Increased serum sTRAIL levels were correlated with survival in bevacizumab-treated metastatic colon cancer. *BMC Cancer* 2012, 12:58. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/5>

MİDE KANSERLİ OLGULARDA TRAIL VE TRAIL-DR4 GEN POLİMORFİZMLERİNİN VE TRAIL SERUM DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

% 18	% 7	% 2	% 14
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 12
2	www.journals.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Haliç Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1