

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**OVARYUM ve ENDOMETRİYUM KANSERLERİNDE
KROMOZOM DÜZENSİZLİKLERİ ve SIK RASTLANAN
p53 GENİ 7. EKZON MUTASYONLARININ TARANMASI**

Bilim Uzmanı
Ayfer PAZARBAŞI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Mülkiye KASAP

ADANA, 08.01.2004

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**OVARYUM ve ENDOMETRİYUM KANSERLERİNDE
KROMOZOM DÜZENSİZLİKLERİ ve SIK RASTLANAN
p53 GENİ 7. EKZON MUTASYONLARININ TARANMASI**

Bilim Uzmanı
Ayfer PAZARBAŞI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Mülkiye KASAP

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE
2002.D.10 nolu proje olarak desteklenmiştir.

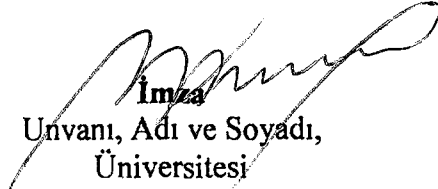
Tez No:

ADANA, 08.01.2004

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora/Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan **OVARYUM ve ENDOMETRİYUM KANSERLERİNDE KROMOZOM DÜZENSİZLİKLERİ ve SIK RASTLANAN p53 GENİ 7. EKZON MUTASYONLARININ TARANMASI** adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından Doktora/Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 08.01.2004


İmza
Unvanı, Adı ve Soyadı,
Üniversitesi
Jüri Başkanı

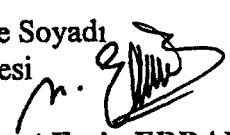
Prof.Dr.Mülkiye KASAP
Çukurova Üniversitesi

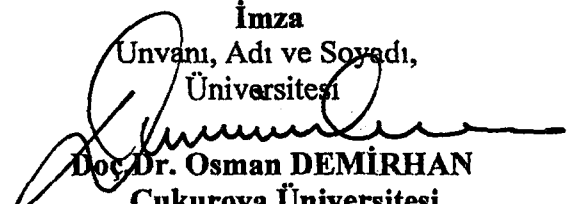

İmza
Unvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

Prof.Dr.Halil KASAP
Çukurova Üniversitesi

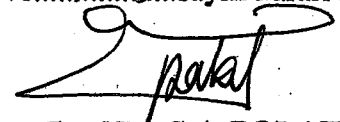

İmza
Unvanı, Adı ve Soyadı,
Üniversitesi

Prof.Dr. Kıymet AKSOY
Çukurova Üniversitesi


İmza
Unvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Doç.Dr. Mehmet Emin ERDAL
Mersin Üniversitesi


İmza
Unvanı, Adı ve Soyadı,
Üniversitesi
Doç.Dr. Osman DEMİRHAN
Çukurova Üniversitesi

Yukarıdaki Tez, Yönetim kurulunun 14.01.2004 tarih ve 2/9-8...sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof.Dr. Sait POLAT
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Beni doğru bir şekilde yönlendiren, yol gösteren, tez konumun seçilmesinde ve tez çalışmamın her aşamasında her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım, Anabilim Dalımız başkanı sayın Prof. Dr. Mülkiye KASAP'a ve değerli hocam sayın Prof. Dr. Halil KASAP'a katkı ve destekleri için sonsuz teşekkürlerimi tüm içtenliğimle sunuyorum. Ayrıca bilimsel ufkumu genişlettiğini düşündüğüm oldukça verimli doktora dersleri için her iki değerli hocama teşekkürü borç bilirim.

Çalışma materyalinin sağlanmasında verdikleri destek için Ç.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.B.D. Öğretim Üyeleri, sayın Prof. Dr. Mehmet Ali VARDAR ve Prof. Dr. Aytekin ALTINTAŞ'a çok teşekkür ederim. Moleküler çalışmalarda verdikleri destek için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D. başkanı sayın Doç. Dr. M. Emin ERDAL'a; Sitogenetik analizdeki desteklerinden ötürü Anabilim Dalımız değerli Öğretim Üyeleri sayın Doç. Dr. Osman DEMİRHAN'a ve sayın Yrd. Doç. Dr. Dilara SÜLEYMANOVA KARAHAN'a; tez çalışmalarım esnasında gösterdikleri desteklerinden ötürü sayın Doç. Dr. Davut ALPTEKİN'e; çalışma dahilindeki olguların patoloji sonuçları ile ilgili değerli katkılarından ötürü Ç.Ü. Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D. Öğretim Üyesi, sayın Prof. Dr. Figen DORAN'a şükranlarımı sunarım. Ayrıca yine çalışmalarım esnasında gösterdikleri destekten ötürü çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. A. İrfan GÜZEL'e, Uzm. Dr. Ramazan GÜNEŞAÇAR'a ve Arş. Gör. Adem ALTINALAN'a; Anabilim dalımızdaki değerli hocalarım, çalışma arkadaşlarım, memur ve personel arkadaşlarıma teşekkürlerimi iletiyorum. Amniyosentez, doku kültürü ve temel sitogenetik tekniklerini öğrendiğim Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genetik Bilim Dalının kapılarını açan değerli hocam sayın Prof. Dr. Nurettin BAŞARAN'a ve değerli eşleri hocam sayın Prof. Dr. Ayşe BAŞARAN'a ve desteklerinden ötürü Yrd. Doç. Dr. Beyhan DURAK, Arş. Gör. Dr. Hakan ÖZÖN ve Arş. Gör. Dr. Işın AK'a çok teşekkür ediyorum.

Beni yetiştiren ve manevi desteklerini her zaman hissettiren sevgili anneme ve babama teşekkürü bir borç bilirim. Her zaman manevi desteklerini gördüğüm aileme sevgilerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa Numarası
Kabul ve Onay	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGE ve TABLOLAR DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	5
2.1. TÜMÖR SÜPRESÖR GENLER ve p53	6
2.2. DÜNYA'DA ve TÜRKİYE'DE KANSER SIKLIĞI	12
2.3. OVARYUM KANSERİ	14
2.3.1.Epityyal ovaryum tümörlerinin moleküler değişiklikleri	15
2.4. ENDOMETRİYUM KANSERİ	17
2.4.1.Sporadik endometriyal kanserlerinin moleküler genetiği	18
2.5. TÜMÖR DOKULARINDAKİ SİTOGENETİK DEĞİŞİKLİKLER	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1. Gereç	26
Kullanılan başlıca cihazlar ve teknik malzemeler	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1.Moleküler Çalışma Yöntemi	28
a)Fenol-Kloroform-İzoamil Yöntemi	28
b)Doymuş Tuz Çözeltisiyle Çöktürme Yöntemi	29
c)p53 geni 7. ekzonunun amplifikasyonunda kullanılan primerler	30

p53 geni 7. ekzonunun primer dizaynı	30
d)p53 geni 7. ekzonunun PCR ile amplifikasyonu	31
e)RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi ile PCR ürünlerinin kesimi	32
f)Kesim ürünlerinin poliakrilamid jel elektroforezi ve yorumlanması	34
3.2.2.Doku kültürü ve Sitogenetik çalışma için kullanılan yöntem	35
Kültürün yapılması	36
Metafaz alanlarının eldesi (Hasat)	36
GTG yöntemi (Trypsin ve Giemsa ile G bantlama) ile preparatların bantlanması ve boyanması	38
Fotoğraflama işlemleri	38
4. BULGULAR	39
4.1. MOLEKÜLER BULGULAR	39
4.1.1.Restriksiyon enzimi kesimleri	41
4.2. SİTOGENETİK BULGULAR	52
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	74
7. KAYNAKLAR	76
8. EKLER	87
EK 1	87
EK 2	96
EK 3	96
9. ÖZGEÇMİŞ	97

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Heterozigosite kaybının belirlenmesi ile bir tümör süpresör genin lokalizasyonu	7
Şekil 2.	p53'ün farklı aktivitelerinden farklı domainleri sorumludur	10
Şekil 3.	Sporadik (Nonfamiliar) ovaryum epitelyal tümör gelişimi için genetik model	16
Şekil 4.	İki tip endometriyal karsinom tipinin ilerleme modeli	18
Şekil 5.	Farklı iki yöntemle izole edilen E1 örneği DNA'larından elde edilen 216 bp. uzunluğundaki amplifikasyon ürünü	40
Şekil 6.	Ovaryum dokularına (O1-O11) ait DNA'ların PCR ürünleri	40
Şekil 7.	Endometriyum (E6-E12) ve ovaryum (O6) dokularına ait DNA'ların PCR ürünleri	41
Şekil 8.	Endometriyum dokularına ait (E1-E11) DNA'ların PCR ürünleri	41
Şekil 9.	Ovaryum kanserlerine (O1-O8) ait PCR ürünlerinin BspLU11I restriksiyon enzimiyle elde edilen kesim ürünleri	42
Şekil 10.	Kontrol doku (K), ovaryum (O9-O11) ve endometriyum (E9-E12) kanserlerine ait PCR ürünlerinin BspLU11I restriksiyon enzimiyle elde edilen kesim ürünleri	43
Şekil 11.	Endometriyum (E1-E8) kanseri örneklerine ait PCR ürünlerinin BspLU11I restriksiyon enzimiyle elde edilen kesim ürünleri	43
Şekil 12.	Ovaryum kanseri (O1-O9) ve kontrol doku (N) örneklerine ait PCR ürünlerinin MaeIII restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri	44
Şekil 13.	Kanserli ovaryum (O10-O11) ve endometriyum dokusu (E10, E11, E12) ile kontrol doku (K) örneğine ait PCR ürünlerinin MaeIII restriksiyon enzimi kesim ürünleri	44
Şekil 14.	Kanserli endometriyum örneklerine ait (E1-E9) PCR ürünlerinin MaeIII restriksiyon enzimi kesim ürünleri	45
Şekil 15.	Kanserli ovaryum (O1-O9) ve kontrol doku (K/ItaI) örneği PCR ürünlerinin ItaI restriksiyon enzimi kesim ürünleri	45
Şekil 16.	Kontrol (Normal) dokuya ait PCR ürününün ItaI ile elde edilen iki fragmanın (107 ve 98 bp'lik) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümü	46
Şekil 17.	Ovaryum kanserli 2 (O10, O11) ve endometriyum kanserli 3 (E10-E12) doku ile bir kontrol doku (K/ItaI) örneğinin PCR ürünlerinin ItaI restriksiyon enzimi kesim ürünleri	47
Şekil 18.	Kanserli endometriyum (E1-E9) örneklerinin PCR ürünlerinin ItaI restriksiyon enzimi kesim ürünleri	47
Şekil 19.	Ovaryum kanseri (O1-O8) örneklerine ait PCR ürünlerinin MspI restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

Şekil 20.	Ovaryum kanseri (O9-O11) ve endometriyum (E10-E12) kanseri örneklerine ait PCR ürünlerinin MspI restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri	48
Şekil 21.	Endometriyum kanseri (E1-E9) ve kontrol doku (K/MspI) örneklerine ait PCR ürünlerinin MspI restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri	49
Şekil 22.	Ovaryum kanseri (O1-O9) ve kontrol doku (K/HinfI) örneği PCR ürünlerinin HinfI restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri	49
Şekil 23.	Ovaryum (O4, O10, O11) ve endometriyum kanseri (E10-E12) ile kontrol doku (K/HinfI) örneklerine ait PCR ürünlerinin HinfI restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri	50
Şekil 24.	Endometriyum kanseri (E1-E9) örneklerine ait PCR ürünlerinin HinfI restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri	50
Şekil 25.		
a,b,c,d,e.	E6'da gözlenen yapısal kromozom anomalileri	53
f,g,h,i.	E6 ve O11 de gözlenen yapısal kromozom anomalileri	54
Şekil 26.		
a,b.	E1 ve O5 te gözlenen yapısal ve sayısal kromozom anomalileri	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.	Birleşik Devletlerde en sık rastlanan kanserler	13
Çizelge 2.	İnsan genomundaki gen oranı en yüksek 30 kromozomal bantın sitogenetik özellikleri ve gen içeriği	22
Çizelge 3.	İnsan p53 geninin (TP53) ekzon 7 kodlayıcı bölgesi ve seçilen amplifikasyon bölgesi ile primerleri gösteren nükleotid dizisi	31
Çizelge 4.	Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu	31
Çizelge 5.	p53 geni 7. ekzondaki 5 mutasyona özgü 5 farklı enzim tarafından kesimin gerçekleştiği reaksiyon koşulları	33
Çizelge 6.	7. ekzondaki 5 mutasyonun normal ve mutasyonlu dizideki bant sayısı ve uzunluklarının RFLP analizi	35
Çizelge 7.	Ovaryum (11), endometriyum (12) dokusu ve normal (1) dokudan (Kontrol) izole edilen DNA'ların saflığı ve konsantrasyonu	39
Çizelge 8.	23 kanserli dokuda triplet 236, 238, 244, 248 ve 259'da saptanan mutasyonlar. N: Normal, H: Heterozigot dokuyu işaret etmektedir.	51
Çizelge 9.	Ovaryum kanserli olgularda gözlenen mutasyonların tümör grade'ine göre sıralanması.	52
Çizelge 10.	11 ovaryum kanseri olgusunun sitogenetiği ve histopatolojik tanıları	56
Çizelge 11.	12 endometriyum kanseri olgusunun sitogenetiği ve histopatolojik tanıları.	58
Çizelge 12.	Ovaryum (11) ve endometriyum (12) kanserli dokularda kromozom başına gözlenen kırılma noktaları (fra, chtb, gap, del) ve klonal değişimler.	63
Çizelge 13.	Ovaryum kanseri gurubunda kromozom başına görülen anomalilerin frekansı (en yüksekten en düşüğe doğru sıralanmıştır)	65
Çizelge 14.	Endometriyum kanseri gurubunda kromozom başına görülen anomalilerin frekansı (en yüksekten en düşüğe doğru sıralanmıştır)	65
Çizelge 15.	Ovaryum kanserli olgularda gözlenen anomalilerin olgulara göre %'si ve tümör grade'ine göre sıralanması.	66
Çizelge 16.	Endometriyum kanserli olgularda gözlenen anomalilerin olgulara göre %'si ve tümör grade'ine göre sıralanması.	66
Çizelge 17.	Dmin yapılar, radial görünüm ve endoreduplikasyonun ovaryum ve endometriyum kanserlerinde görülme oranı (Anomali saptanan alan sayısı/Analiz edilen alan sayısı: % oran)	66
Çizelge 18.	Farklı miktarlarda Agaroz içeren jellerin ayrıştırma aralığı.	89

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devamı)

Çizelge 19.	Çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleazlar, özellikleri ve çalışma şartları.	92
Çizelge 20.	Poliakrilamid jelde DNA'ları etkili ayırıştırma aralığı.	93



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Ace	Asentrik
Apaf-1	Apoptoz aktive edici faktör
APS	Amonyum Per Sülfat
BAX	Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	B hücresi lösemi proteini
Bç	Baz çifti
C	Sitozin
°C	Derece santigrat
c-fra	Sık gözlenen ya da common frajil bölge
CGH	Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonu
chtb	Kromatid kırığı
C-terminal	Karboksi uç
del	Delesyon
dmin	Double minute
DNA	Deoksiribo Nukleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
Dup	Duplikasyon
E	Endometriyum
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
End	Endoreduplikasyon
EtBr	Etidyum Bromid
FHIT	Frajil Histidin Triad geni
FISH	Fluoresan in Situ Hibridizasyon
Fra	Frajil bölgeler

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (Devamı)

G	Guanin, giemsa
GTG	Giemsa ve Tripsinle G bantlama
h ⁺	Heterokromatin bölge
r-fra	Nadir gözlenen ya da kalıtsal frajil bölgeler
HNPCC	Kalıtsal Nonpolip Kolorektal Kanser
hsr	Homojen boyanan bölgeler
ISCN	Uluslararası İnsan Sitogenetik İsimlendirme Sistemi (International System for Human Cytogenetic Nomenclature)
inv	İnversiyon
Kb	Kilo baz
LFS	Li-Fraumeni Sendromu
LMP	Düşük Malignant Potansiyelde (Low Malignant Potential)
LOH	Heterozigotluk Kaybı (Loss of Heterozygosity)
M	Molarite
Mb	Mega baz
mg	Miligram
ml	Mililitre
µg	Mikrogram
ng	Nanogram
N-terminal	Amino uç
O	Ovaryum
OD	Optik Yoğunluk (Optical Density)
p	Kromozomun kısa kolu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PCI	Fenol-Kloroform-İzoamil
pmol	Pikomol
R	Reverse bantlama

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (Devamı)

RB	Retinoblastoma
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
q	Kromozomun uzun kolu
Q	Quinacrine bantlama
S	Sentez
SDS	Sodyum Dodesil Sulfat
STE	Sitrat-Tris-EDTA
SV40	Simian Virus 40
T	Timin, Telomer
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TBP	Tata Bağlayıcı Protein
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N', TetraMetilEtilen-Diamin
ter	Terminal, uç
TSG	Tümör Süpresör Gen
U	Ünite (Unit)
UV	Mor Ötesi (Ultra Viole)

ÖZET

OVARYUM VE ENDOMETRİYUM KANSERLERİNDE KROMOZOM DÜZENSİZLİKLERİ ve SIK RASTLANAN P53 GENİ 7. EKZON MUTASYONLARININ TARANMASI*

Organizmada tümör süpresör gen olarak bilinen p53 geni, hücre siklusunun kontrolünden sorumlu olan bir proteini kodlar. İnsan kanserlerinin yaklaşık %50 sinden p53 mutasyonları sorumlu olduğundan malign insan kanserlerinin çoğunda p53 geni moleküler değişimlerin hedefi olmaktadır. Tüm kanser tipleri gibi, jinekolojik kanserlere de hücrelerin çoğalma, farklılaşma ve ölümlerini düzenleyen genlerde oluşan değişiklikler neden olmaktadır. Dolayısıyla p53'ün fonksiyon kaybı veya inaktivasyonu hücre proliferasyonunun kontrolü bozulacak, hücreler DNA hasarı olsa bile canlı kalacak ve kontrolsüz çoğalmayı sürdürecektir. Toplam olarak 11 ekzon ve 393 tripletten oluşan p53 geninde nokta mutasyonlarının sıkça görüldüğü sıcak noktalar; 129-146, 171-179, 234-260 ve 270-287. tripletler arasında yoğunlaşmaktadır. Bu tripletler 5 ve 8. ekzonlar arasındaki bölgeyi içermektedir. Ovaryum ve endometriyum kanserlerinde görülen nokta mutasyonları daha sık olarak 7. ekzonda (%46) ve özellikle 236 (%5.4), 238 (%5.4), 244 (%8.1), 248 (%19) ve 259 (%8.1) tripletlerinde yoğunlaşmaktadır.

Tümörlerde moleküler değişiklikler olduğu gibi 3000-5000 kb'dan daha büyük bölgeleri etkileyen sitogenetik değişiklikler de mevcuttur. Birçok tümörde yüksek oranda kromozomal dengesizlik bulunmuştur.

Çalışmamızda Ç.Ü. Tıp Fak. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalına başvuran 23 hastanın ovaryum ve endometriyum karsinomlu dokusundan DNA lar izole edilerek, p53 geninin ovaryum ve endometriyal kanserlerde en sık mutasyona uğrayan 7. ekzonu PCR'la çoğaltıldı. p53 mutasyonlarını belirlemek amacıyla BspLU11I, MaeIII, Itai, MspI ve Hinfl enzimleri kullanılarak RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) analizi uygulandı. Bunun yanısıra, kanserli ovaryum ve endometriyum dokularına ait örneklerden, primer hücre kültürü yapılarak metafaz alanları elde edildi ve kromozomlardaki değişiklikler sayısal ve yapısal yönden karakterize edildi.

12 endometriyum ve 11 ovaryum kanseri olgusuna ait PCR ürünlerinin BspLU11I enzimiyle kesimi sonucunda kodon 236'da 1; Itai enzimiyle kesimi sonucunda kodon 244'te 5 olguda heterozigotluk görüldü. MaeIII, MspI ve Hinfl enzimleriyle kesim sonucunda kodon 238, 248 ve 259'da tüm olgularımızda herhangi bir mutasyon saptanmadı. Ovaryum gurubunda kodon 236'daki mutasyon, 11 olguda 1 (%9) oranında bulundu. Kodon 244'teki mutasyon ise 11 olguda 5 (%45) oranında görüldü. Ovaryum gurubunda kodon 238, 248 ve 259'da; Endometriyum gurubunda ise çalşılan 5 kodonda da bilinen mutasyonlara rastlanmadı.

Çalışmamızda, ovaryum ve endometriyum kanseri sitogenetiğinde 3. kromozomdaki anomaliler birinci, 5. kromozomdaki anomaliler ikinci ve 1. kromozomdaki anomaliler üçüncü sırada yer aldı. Tümörigenez sürecinde ortaya çıkan primer değişimler olan ve o kanser tipi için tanısal öneme sahip marker olarak kullanılabilen klonal değişimler ovaryum kanseri olgularımızda; 1q21, 1q32, 3p25, 3q11, 5p13, 5q31, 12p10, 12q12 ve 14q13 bölgelerinde; endometriyum kanseri olgularımızda ise; 1p21, 1p22, 1p32, 1p36, 1q21, 1q31, 1q32, 2p13, 2q11, 2q21, 2q35, 3p14, 3p21, 3p23, 3q21, 3q25, 4p15, 4q21, 5p15, 5q22, 5q31, 6q21, 7q21, 7q22, 9q22, 9q34, 10p13, 11p15, 11q23, 11q24, 12p12, 12p13, 12q13, 12q24, 13q14, 13q22, 16p13, 17p12, 17q21, 21p13, Xq26 ve Xq27 bölgelerinde gözlemlendi. Ayrıca kanser kırılma noktaları ve frajil bölgelerden 1q21, 1q32, 3p21, 7q22 ve 11q23 bölgeleri ovaryum kanseri ve 1p36, 1q32, 2p12, 3p21, 7q22, 9q34, 11p15, 11q23, 12q13, 14q11, 14q32, 16p13 ve 21q22 bölgeleri de endometriyum kanseri olgularımızda gözlemlenmiştir. Bu kanser tipleri ile ilişkili aday genler araştırılırken bu bölgelere özel önem verilmesi gerektiği düşünülmektedir. Çalışmamızda ovaryum ve endometriyum kanserlerinde belirlenen kromozomal klonal değişimler, bu kanserlerin gelişiminde rol oynayan major genlerin kromozom lokalizasyonlarının araştırılmasında yol gösterici olabilecektir.

Anahtar Sözcükler: Endometriyum kanseri, Kanser sitogenetiği, Mutasyon, Ovaryum kanseri, p53.

ABSTRACT

CHROMOSOMAL ABNORMALITIES AND FREQUENT P53 GENE MUTATIONS SEEN IN EXON 7 IN ENDOMETRIAL AND OVARIAN CARCINOMAS

In organism p53 known as a tumor suppressor gene encodes a protein that controls the cell cycle. In majority of human malignancies, p53 is the target of molecular alterations as approximately 50% of human cancers are related to mutations of this gene. The causation factors, such as alterations in the genes which regulate the proliferation, differentiation and cell death are the same in all types of the cancers as well as the gynecological neoplasms. So that, loss of function or inactivation of p53 will upset the control of cell proliferation and the cells with DNA damage will survive and proliferate in an uncontrollable manner. The tumor suppressor gene p53 is located at chromosome region 17p13 and is composed of 11 exon and 393 triplets in total. Majority of hot spots are focused on between triplets of 129-146, 171-179, 234-260 and 270-287. These triplets include the sites between exon 5 and 8. The mutations in ovarian and endometrial cancers are more frequently seen in exon 7 (46%), especially at the triplets of 236 (5.4%), 238 (5.4%), 244 (8.1%), 248 (19%) and 259 (8.1%).

However, along with molecular alterations, the presence of cytogenetic alterations affecting greater regions about 3000 to 5000 kb is a common occurrence in tumor tissues. Chromosomal imbalance has also been found at high rate in most of the tumors.

In our study, 23 DNA samples isolated from ovarian and endometrial cancer tissues which were obtained from patients who hospitalized at University of Cukurova, Medical Faculty, Department of Obstetrics and Gynecology. Exon 7 of p53 gene which frequently mutated in ovarian and endometrial cancers was amplified from 23 DNA samples. BspLU11I, MaeIII, ItAI, MspI and HinfI restriction enzymes were used to determine p53 gene mutations at the points 236, 238, 244, 248 and 259 respectively by RFLP (Restriction Fragment Polymorphism) analysis. Metaphases were also obtained from cultured cancer tissues (described above) for characterization of structural and numerical chromosomal alterations.

Hetrozygosity was seen in 1 case of 11 ovarian cancer (%9) at triplet 236 by BspLU11I digestion and in 5 case of 11 ovarian cancer (%45) at triplet 244 by ItAI digestion. In all cases no mutations were observed at triplets 238, 248 and 259 by MaeIII, MspI and HinfI digestion. No evidence of mutations were seen at triplets 238, 248 and 259 in ovarian cases and at all 5 triplets in endometrial cases analyzed for known mutations.

In our cytogenetic studies performed on ovarian and endometrial cancers, abnormalities were seen most frequently on chromosome 3 then on chromosome 5 and then on chromosome 1. Clonal alterations occurring during tumorigenesis are used as a

marker having a diagnostic importance. These alterations are observed at 1q21, 1q32, 3p25, 3q11, 5p13, 5q31, 12p10, 12q12, 14q13 regions in ovarian cancer cases and at 1p21, 1p22, 1p32, 1p36, 1q21, 1q31, 1q32, 2p13, 2q11, 2q21, 2q35, 3p14, 3p21, 3p23, 3q21, 3q25, 4p15, 4q21, 5p15, 5q22, 5q31, 6q21, 7q21, 7q22, 9q22, 9q34, 10p13, 11p15, 11q23, 11q24, 12p12, 12p13, 12q13, 12q24, 13q14, 13q22, 16p13, 17p12, 17q21, 21p13, Xq26, Xq27 regions in endometrial cancer cases. The cancer breakpoints and fragile sites were also investigated in ovarian (1q21, 1q32, 3p21, 7q22, 11q23) and endometrial (1p36, 1q32, 2p12, 3p21, 7q22, 9q34, 11p15, 11q23, 12q13, 14q11, 14q32, 16p13, 21q22) cases. We thought that, the clonal chromosomal alterations observed in the ovarian and endometrial cases may lead to find the chromosomal locations of the major genes that play an important role in progression of these malignancies.

Key words: Endometrial cancer, Cytogenetics of cancer, Mutation, Ovarian cancer, p53.



1.GİRİŞ

Normal gelişim ve hücre farklılaşması, genlerle düzenlenen ve yönetilen biyolojik bir süreçtir. Burada görev yapan genlerden birisi olan tümör süpresör genler normal olarak hücre bölünmesini baskırlar. Bu genlerin baskılanması veya kayıpları durumunda hücre proliferasyonunda (çoğalmasında) artış söz konusu olabilir. En önemli tümör süpresör genlerden birisi p53 genidir. Bu nedenle p53 geni insan kanserlerinin pekçoğundan sorumlu tutulmakta ve kanserin moleküler yapısının anlaşılmasında çok yoğun olarak araştırılmaktadır^{1,2,3,4,5,6,7,8}.

17. kromozomun kısa kolunda lokalize olan p53 geni, hücre siklusunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörünü kodlar ve p53 proteini sentezlenir. DNA'da herhangi bir hasar oluşunca p53 proteininin miktarı artar ve hasar tamir oluncaya kadar DNA replikasyonunu ve hücre bölünmesini durdurur. Böylece hasarın bir mutasyona dönüşmesini engeller. Bu rolünden dolayı p53, "genom gardiyanı" olarak adlandırılır. Hücrede DNA hasarı, artmış p53 ekspresyonuna ve hücre döngüsünün G1 evresinde durdurulmasına yol açar. Eğer DNA tamiri başarılı olursa hücre döngüsüne devam eder. Eğer bu aşamadaki kontrol başarısız olursa veya başka sebeplerden ötürü hücre düzensiz bölünürse, p53 apoptoz olarak adlandırılan programlı hücre ölümünü tetikleyerek anormal hücrenin, bir tümör geliştirmeden ölmesine sebep olur^{1,9,10,11}.

İnsan kanserlerinin yaklaşık %50'sine p53 mutasyonları sebep olmakta, böylece malin insan kanserlerinin çoğunda p53 geni sık sık moleküler değişimlerin hedefi olmaktadır. Bu nedenle, p53 tümör süpresör geninin nokta mutasyonları, insan kanserlerinde şimdiye kadar tanımlanmış en yaygın moleküler değişimdir². Tüm kanser tipleri gibi, jinekolojik kanserlerin de nedeni hücrelerin çoğalma, farklılaşma ve ölümlerini düzenleyen genlerde oluşan değişikliklerdir. Dolayısıyla p53'teki fonksiyon kaybı veya inaktivasyon, hücre bölünmesindeki kontrolün bozulmasına sebep olmakta, hücreler DNA hasarı olsa bile canlı kalmakta ve kontrolsüz çoğalmayı sürdürmektedir¹².

11 ekzon ve 393 tripletten oluşan p53 geninde nokta mutasyonlarının sıkça görüldüğü sıcak noktalar; 129-146, 171-179, 234-260 ve 270-287 tripletler arasında yoğunlaşmaktadır. Bu tripletler 5. ve 8. ekzonlar arasındaki bölgede yer almaktadır¹³. Ovaryum ve endometriyum kanserlerinde görülen nokta mutasyonları daha sık olarak 7. ekzonda (%46) ve özellikle 236.(%5.4), 238.(%5.4), 244.(%8.1), 248.(%19) ve

259.(%8.1) tripletlerde yoğunlaşmaktadır^{14,15,16,17,18}. Bu mutasyonlar sonucu oluşan kanser hücrelerinin nukleuslarında, yarılanma ömrü uzamış anormal p53 proteinleri görülür. Çünkü bu hücrelerde p53 genindeki mutasyonla p53 proteini aşırı eksprese olmuştur.

Ovaryum kanserleri kadınlarda ölüme sebep olan kanserler arasında 5. sırada yer almaktadır¹⁹. Ovaryum kanserlerinin ovaryum yüzeyini kaplayan mezotelyal tabakadan ortaya çıktığı düşünülmektedir¹⁹. Bu kansere bağlı ölümlerin her yıl tüm jinekolojik kanserler arasında ikinci sırada olduğu bildirilmektedir²⁰. Ovaryum kanserlerinde görülen karmaşık moleküler genetik değişiklikler, tümör histolojik grade'i ile doğru orantılı olarak artmaktadır^{21,22,23,24,25}. Düşük grade ve ileri grade ovaryum kanserlerinde meydana gelen değişiklikler, başlangıçta aynı olduğu halde [ortaya çıkış sırasına göre Telomeraz aktivasyonu²⁶, DNA metilasyonundaki değişiklikler²⁷, p53'teki mutasyonlar^{28,29}, birçok LOH (Loss of Heterozygosity: Heterozigotluk kaybı) ve anöploidide sebep olan hücre döngüsü hataları gibi] son aşamada (düşük grade ovaryum kanserlerinde kromozom 6q veya 17 de LOH; ileri grade ovaryum kanserlerinde kromozom 13q veya Xq da LOH) farklılıklar göstermektedir²¹. Moleküler genetik çalışmalar benin ve malin ovaryum epitelyal tümörlerinin, bir hastalığın birbirini takip eden evreleri olmadığını göstermiştir.

Ovaryum kanserlerinin %57'sinde sadece p53 mutasyonları görülmekte fakat çok sayıda farklı genetik değişiklikte bu kansere neden olmaktadır^{30,31,32}. Çeşitli kromozomlardaki heterozigotluk kaybının sıklığı ile ilgili bilgiler de oldukça fazladır^{21,33,34}. Ayrıca birçok karşılaştırmalı sitogenetik analizler de rapor edilmiştir^{22,35,36,37}. Spesifik moleküler anomalilerin hastalığın prognozu ile ilişkilendirilebileceği^{38,39,40,41}, HER-2/neu^{42,43,44} ve p53⁴⁵ gibi spesifik genlerin de gen terapi için hedef genler olabileceği gösterilmiştir.

Endometriyal kanser, günümüzde Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Batı Avrupa'da en sık görülen jinekolojik kanser tipidir⁴⁶. Ülkemizde ise jinekolojik kanserler arasında 3. sırada yer almaktadır²⁰. Son yıllarda özellikle DNA tamirinde görev alan genler ve hücre sel proliferasyondan sorumlu bazı genlerin endometriyal karsinogenezde önemli olduğu düşünülmektedir⁴⁶.

Diğer kanserlerin aksine, endometriyal kanserlerde heterozigotluk kaybı gözlenen lokus sayısı çok azdır. En sık allelik kayıp gözlenen lokus 17p dir. 17p bölgesinde p53 geni yer almakta ve bu bölgedeki mutasyon veya delesyonların kötü prognoz göstergesi olduğu düşünülmektedir^{46,47}.

Endometriyal kanserlerde p53'ün değerlendirilmesi büyük oranda immünohistokimyasal yöntemlerle olmuştur. Endometriyal kanserlerin %11-45'inde p53 proteininin aşırı ekspresyonu rapor edilmiştir^{46,47,48,49,50,51}. p53'ün immünohistokimyasal olarak saptanması gende mutasyon varlığını işaret etmekte ve p53'ün aşırı ekspresyonu yüksek grade kanserlerde daha fazla olmaktadır (yüksek grade kanserlerde %41.7; düşük grade kanserlerde %12)^{30,46,49,51,52,53}. Analizler endometriyal kanserlerdeki p53 mutasyon sıklığının %9.5-23 gibi geniş bir aralığa sahip olduğunu ve bunun tümörün evre, grade ve tipine bağlı olabileceğini göstermiştir^{46,47}.

Tümörlerde moleküler düzeyde incelenen değişiklikler olduğu gibi 3000-5000 kb'dan daha büyük bölgeleri etkileyen sitogenetik değişiklikler de mevcuttur. Birçok tümörde yüksek oranda kromozomal dengesizlik bulunmuştur⁵⁴. Tümörlerdeki sitogenetik değişiklikler, kromozomların tamamına veya birkaçına ilave (poliploidi, heteroploidi) veya kayıplar şeklinde olan sayısal düzensizlikleri, translokasyon, inversiyon, delesyon, insersiyon ve duplikasyonlar gibi yapısal anomalileri kapsamaktadır⁵⁵. Onkogenler ile yakın ilişkisi olduğu saptanan kromozomal frajil bölgeler, kromozomun bir yada iki kromatidinde ortaya çıkan çoğunlukla boyanmayan gap yada seyrek olarak kırık ve nadiren delesyonlar şeklinde gözlenmektedir⁵⁵. Yüksek grade invazif tümörlerde anöploidilere sık rastlanmış ve zayıf prognozla ilişkilendirilmiştir⁵⁶.

Hayatta kalma oranını iyileştirmek için erken, doğru ve güçlü tanısal özelliği olan moleküler markırlar gerekmektedir²⁵. Mutant p53 proteinine bağlanmak ve stabilitesini sağlamak üzere üretilmiş ilaçlarla kanser terapisi, gelecekteki tedavi adaylarındandır¹⁰. Herbir mutasyonun p53'ü nasıl inaktive ettiğinin moleküler seviyede karakterizasyonu, bu tarz ilaçların tasarımına da yardımcı olacaktır.

Bu tez çalışmasında, p53 geninin birçok insan kanserinin gelişimine katıldığı gerçeğinden yola çıkarak, jinekolojik kanserlerde de p53 geninde ortaya çıkan değişiklikler ve sıklıklarının belirlenmesi planlanmıştır. Jinekolojik kanserlerden ovaryum ve endometriyum kanserlerinde, moleküler genetik ve sitogenetik analiz yöntemleri ile kanser hücrelerindeki kazanılmış değişikliklerin, kromozom ve DNA düzeyinde incelenmesi hedeflenmiştir. Kanserli ovaryum ve endometriyum dokularında hedeflenen amaç iki basamakta gerçekleştirilmiştir;

1-Kanserli ovaryum ve endometriyum dokularının DNA'larının izole edilerek p53 geninin 7. ekzonunun amplifiye edilmesi ve en sık mutasyona uğrayan 5 tripletinin

nokta mutasyonları bakımından RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) analiz yöntemi ile taranması ile,

2-Kanserli ovaryum ve endometriyum dokularına ait örneklerden, primer hücre kültürü yapılarak metafaz alanlarının elde edilmesi ve kromozomlardaki değişikliklerin sayısal ve yapısal yönden karakterize edilmesi ile gerçekleştirilmiştir.



2-GENEL BİLGİ

Kanser, hücre proliferasyonunun bozulmasıyla ortaya çıkan bir olgudur. Hücre bölünmesinin gerek duyulduğunda gerçekleşmesini sağlayan birçok biyolojik kontrol sistemi mevcuttur. Hücre proliferasyonunu başlatıcı çeşitli yollar vardır. Hücreler, ardarda gelen çeşitli ara proteinlerin fosforile edilmesine sebep olan çeşitli sinyal iletim yolları ile aktive edilir ve sonuçta hücre bölünmesi ile ilgili proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonu uyarılır. Gerektiği zaman apoptoz tetiklenir ve hücreler selektif olarak imha edilir. Kanser oluşumu genellikle somatik hücrelerde proliferasyon ve apoptozu etkileyen mutasyonlarla ortaya çıkar^{1,2,6}.

İnsan kanserlerine iki tip gende meydana gelen mutasyonların sebep olduğu belirlenmiştir; proto-onkogenler ve tümör süpresör genler. Resesif aktivite gösteren **proto-onkogenler**, hücre döngüsünün kontrolünü sağlarlar. Proto-onkogenlerin kansere sebep olan mutant allellere sahip ve dominant aktivite gösteren genlere **onkogen** adı verilir. Tümör süpresör genler, normal şartlarda kontrolsüz hücre proliferasyonunu önlerler. Diğer mutasyonlarla birlikte bir tümör süpresör allelinin eksikliği, birçok kanser çeşidinde oldukça yaygındır. Kansere sebep olan genleri etkileyen genomik değişiklikler: protein fonksiyonunu değiştiren veya tümör süpresör genleri inaktive eden nokta mutasyonları; normal tümör süpresör allelinin kaybına yolaçan delesyonlar; onkogenik proteinlerin aşırı üretimine sebep olan translokasyonlar ve bazı onkogenlerin kopya sayısının artmasına sebep olan lokalize DNA amplifikasyonlarıdır.

Kanserin birçok kalıtsal formu mevcuttur. Bu olguların çoğunda, bir mutant onkogen veya tümör süpresör genin kalıtımı, bireyi özel bir kanser tipi için uygun duruma getirir. Kanserlerin çoğunda birçok gen rol oynarken, bazı kanserlerde tek gen mutasyonları, kanseri uyarmak için yeterli olmaktadır.

Li-Fraumeni sendromu (LFS) gibi bazı kalıtsal kanserler, çok çeşitli hücre tipinde tümörlerin gelişmesine sebep olur. LFS ailelerinde, p53 proteinini kodlayan p53 geninin yabancıl allelindeki mutasyonlar birçok kanser çeşidinde görülmektedir. Normal p53, hücre döngüsünün G1/S geçiş noktasını bloke ederek ve programlı hücre ölümünü (apoptoz) uyarak DNA hasarına karşı hücre sel cevapta önemli rol oynar^{7,9}.

2.1.TÜMÖR SÜPRESÖR GENLER ve p53

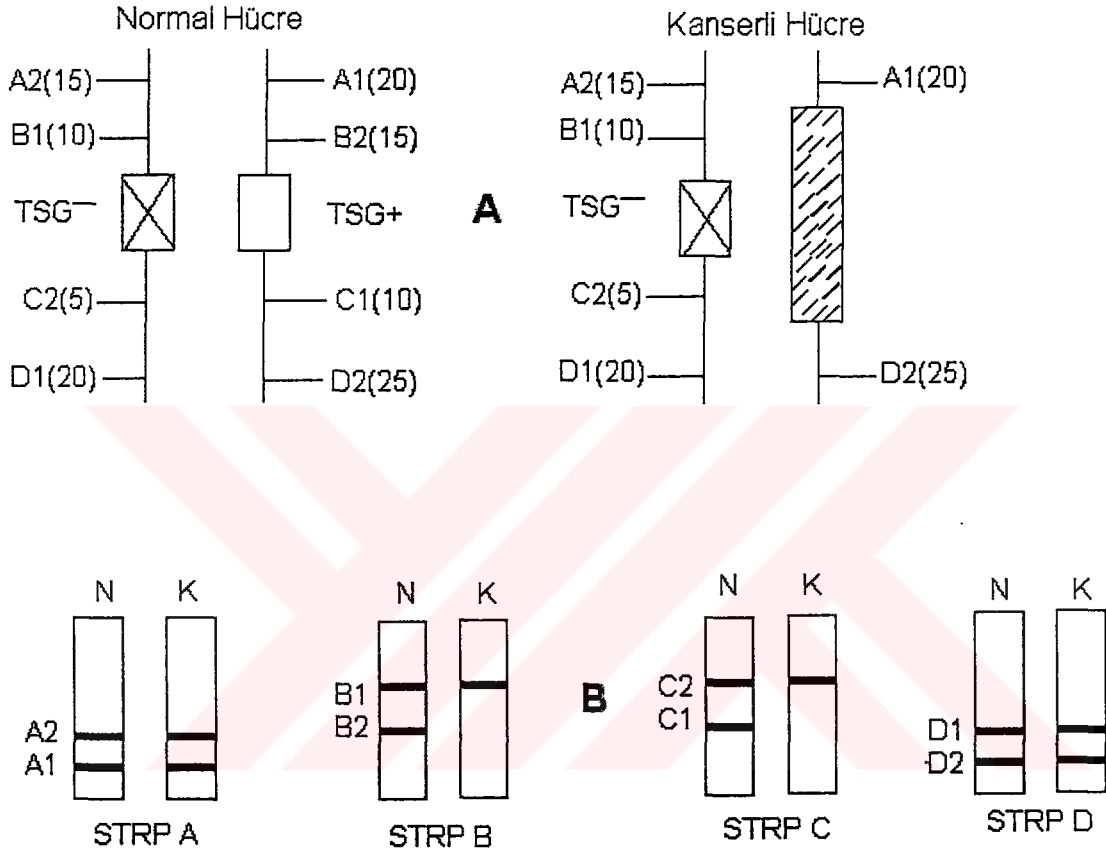
Proto-onkogen ve onkogen proteinlerinin aksine, birçok tümör süpresör genin kodladığı proteinler hücre çoğalmasını inhibe eder. Tümör süpresör genlerin inaktivasyonu, negatif regülatör proteinleri elimine ederek tümör gelişimine sebep olur. Bazı durumlarda, tümör süpresör proteinler, onkogen ürünlerinin stimüle ettiği aynı hücrenin kontrol yollarını inhibe eder.

Tümör süpresör genler (TSG), normal olarak hücre bölünmesini baskılayan bir grup gendir. Her iki allelde normal işlevin kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine ve tümör büyümesine neden olur. Normal allelin varlığı tümör gelişimini baskılar. Bir etki oluşması için işlev kaybı her iki alleli de etkilemelidir (yani tümör süpresör genlerin mutasyonları, hücresel düzeyde resesiftir). Bunun için iki, hatta bazen daha fazla mutasyonal olay gerekir. Şimdiye kadar 10 civarında tümör süpresör gen tanımlanmıştır^{1,2,3,5,7}.

Tek alleldeki değişikliğin normal işlevi değiştirdiği hücrel onkogenlerin aksine, tümör gelişimi öncesinde bir tümör süpresör genin her iki alleli de işlev kaybetmelidir. Birinci olay genellikle, baz değişikliği veya delesyon gibi bir mutasyondur. Diğer alleli etkileyen ikinci olay da bir mutasyon olabilir, fakat hücre bölünmesi (mitozda nondisjunction) veya başka mekanizmalar (örn; gen değişimine neden olan mitotik rekombinasyon) sonucu işlev kaybı daha sıklıkla görülür.

İlgili tümör süpresör gen bölgesindeki DNA markırları yönünden heterozigot bireylerin yaklaşık yarısında, bir allelin kaybı southern blot analizi ile gösterilebilir. Normal somatik hücrelerin aksine, tümör hücrelerinde, TSG'in allellerinden biri delesyona uğrarsa sadece bir alleli içerirler. Bu durum heterozigotluk kaybına (LOH) neden olur. Diğer allel, büyük olasılıkla bir mutasyonla değişmiştir. Bu durumda fonksiyonel TSG proteini üretilemez ve hücre kanser baskılama kapasitesini kaybeder. Replikasyonda başarısızlık ve kromozom düzensizliği ortaya çıkar⁵⁷. LOH'un gösterilmesi ile mutant allel belirlenebilir. Bir tümör süpresör genin varlığının göstergesi olarak LOH tanımlanır. LOH'u saptamak ve bir kromozom bölgesine lokalize etmek için aynı bireyin kanserli ve normal hücrelerinin ardışık kısa tekrar polimorfizmi (STRP: Small Tandem Repeat Polymorphism) analizi kullanılır. Bir kromozomal delesyon, TSG alleli ile birlikte bazı komşu allellerin de kaybına neden olabilir. TSG lokusunun çevresinde yer alan bu alleller, polimorfik ise bu lokustaki heterozigotluk kaybı daha da yüksek olacaktır. Polimorfik allellerin heterozigotluk kaybını belirleme çalışmaları (LOH), 20 kadar TSG'nin tanımlanmasına neden

olmuştur. Kanser hücrelerindeki kayıp polimorfik alleller, bir TSG lokusu ile genellikle sıkı bir bağlantı içindedir. Kısaca geniş bir STRP prob paneli, aynı kansere sahip çok sayıda hastanın normal ve kanserli hücrelerinin DNA'larını taramak amacıyla kullanılmaktadır^{2,7,58}. Şekil 1'de polimorfik marker lokuslar gösterilmiş ve STRP kromozom haritasına dayanan bir delesyon tanımlanmıştır.



Şekil 1. Heterozigotluk kaybının belirlenmesi ile bir tümör süpresör genin lokalizasyonu. A: TSG normal hücrede heterozigottur. B: PCR'a dayanan STRP analizinin sonucunun şematik gösterimi. Her bir STRP için farklı primer kullanılmıştır. B ve C lokuslarının kaybı TSG lokusunu A ve D arasına yerleştirir.

Supresör gendeki ilk mutasyon ya zigotta var olabilir (germinal mutasyon; yani, etkilenmiş ebeveynden geçen ya da yeni bir değişim sonucu oluşan germ hücresi mutasyonu) ya da ilgili dokudaki tek bir hücrede oluşabilir (somatik mutasyon). Bir alleldeki işlev kaybı (1.olay) hücreyi tümör gelişimine yatkınlaştırır⁷. Germinal mutasyon sonucu tüm hücreler etkilenir. Tümör, ikinci allelin işlev kaybından sonra ortaya çıkar. Tek bir hücrede somatik mutasyon olduğunda, ikinci allelin işlev kaybı aynı hücreyi nadiren etkiler. Fakat germ hücre mutasyonunda, tüm hücreler ilk mutasyonu taşıdığından, yani yatkınlaştığından ikinci allelde işlev kaybı daha sıktır. Somatik mutasyonda tümör sporadik olarak ortaya çıkar (kalıtsal değil) ve tek bir

hücreden tek odakta gelişir. Germ hücre mutasyonu sonucu oluşan kalıtsal formda, farklı hücrelerden birkaç tümör ortaya çıkabilir (çok odaklı tümör). Kalıtsal formda, tümöre yatkınlık, otozomal dominant kalıtım gösterir⁷.

Tümör süpresörler, hücre proliferasyonunda artışa neden olan fonksiyon kaybı mutasyonları ile tanımlanmışlardır. RB (Retinoblastoma) geninin her iki kopyası delesyona uğramış veya inaktive olmuşsa retinoblastoma gelişmesine sebep olur.

Kanserin moleküler yapısının incelenmesinde üzerinde en çok durulan ve araştırmaların yoğun olarak yapıldığı tümör süpresör gen p53 genidir (moleküler büyüklüğünden ötürü bu şekilde isimlendirilmiştir). Hemen tüm kanser tipleri ile bağlantı göstermesi, pek çok fonksiyonu yerine getirmesi bu genin çok geniş çaplı incelenmesine neden olmuş ve hatta 1993 yılında *Science* dergisi tarafından yılın molekülü seçilmiştir

p53 genindeki mutasyonlar, insanlarda, farklı malin tümör hücrelerinde en sık görülen genetik değişikliklerdendir. p53 geni kromozom 17'nin kısa kolu (17p13.1-p12) üzerinde bulunur ve 53000 daltonluk bir çekirdek fosfoproteinini kodlar. p53 proteini bir transkripsiyon faktörüdür ve hücre döngüsünün önemli bir düzenleyicisidir. Mutasyonla ya da DNA tümör virusunun onkogen proteini tarafından inaktive edilmesiyle, hücre döngüsünün düzeni bozulur ve tümör gelişebilir^{6,59,60}.

p53 geninde 11 ekzon ve 393 triplet bulunur. p53 genindeki mutasyonlar; 129-146, 171-179, 234-260 ve 270-287 tripletlerinde olmak üzere dört bölgede (sıcak noktalar) yoğunlaşmıştır. Bu bölgeler, 5-8. ekzonlardadır^{13,61}. Bu sıcak noktalar işlevsel önemlerini belirtecek şekilde evrimsel olarak korunmuşlardır^{62,63,64}. İnsan kanserlerinin yarısından çoğunda ya p53 proteini üretilmez veya p53 genindeki mutasyon sonucu hatalı üretilir. p53 ilk olarak SV40 ile transforme hücrelerde T antijenine bağlı olarak bulunmuştur. Birçok transforme hücre veya tümör hücre hatlarında p53 proteininin miktarında büyük çapta artış izlenmiştir. p53 ile ilgili ilk çalışmalarda klonlanmış p53'ün hücreye verilmesinin ardından hücrenin ölümsüz hale geçtiği gözlenmiştir. Bu deneyler p53'ün onkogen sınıfına dahil edilmesine neden olmuştur⁶.

p53'ün bütün transforme formları mutant proteine dönüşmekte ve hepsi yabancı tip proteinin çalışmasını engelleyen dominant negatif mutant kategorisine girmektedir. Bir dominant negatif mutantın en yaygın formu, mutant ve yabancı alt üniteleri içeren ve yabancı alt üniteleri fonksiyon görmeyen heteromerik protein formudur. p53'ün mutant ve yabancı alt üniteleri bir araya geldiğinde oluşan tetramer, mutant yapıdadır. Her iki allelin delesyonuyla veya bir allelde bir missense nokta mutasyonu ile aynı fenotip

gözlenir. Yani bir allelde nokta mutasyonu olduğu zaman mutant p53 alt ünitesi proteinin fonksiyonunu bozacak ve büyüme sınırsız olacaktır. Her iki allelin delesyonu durumunda da p53 proteini üretilmeyeceğinden radyoaktiviteye maruz kalma durumunda p53'ün hedef genleri aktive edilemeyecek ve DNA replikasyonu durdurulamayacaktır. p53'ün kaybı muhtemelen hücrelere çoğalma avantajı sağladığından, birçok insan kanserinde p53 mutasyonları birikmektedir. Yani yabancı p53 sınırlı çoğalma için gereklidir. Çok çeşitli kanserlerde görülmesi p53'ün dokuya özgü bir olay olmadığını düşündürmektedir. Fakat bazı durumlarda hücre proliferasyonunun kontrolündeki kayıplar sekonder olarak ortaya çıkabilir ve birçok tümörde büyümeyi kolaylaştırabilir. Yani normal bir hücre aslında sınırsız büyüme kapasitesine sahiptir fakat p53 tarafından baskılanır. p53'ün kaybının sınırsız büyümeye neden olduğu açıktır^{6,10}.

Kültür ortamında hücrelerin çeşitli onkogenlerle transformasyonunu inhibe etmesi p53'ün tümör süpresör olarak tanımlanmasına sebep olmuştur. p53'ü olmayan mutant fareler yaşayabilir fakat erken evrede çeşitli tümörler geliştirirler. Bu durumda sınırsız büyümeye yol açan bir missense mutasyon ihtimali yoktur.

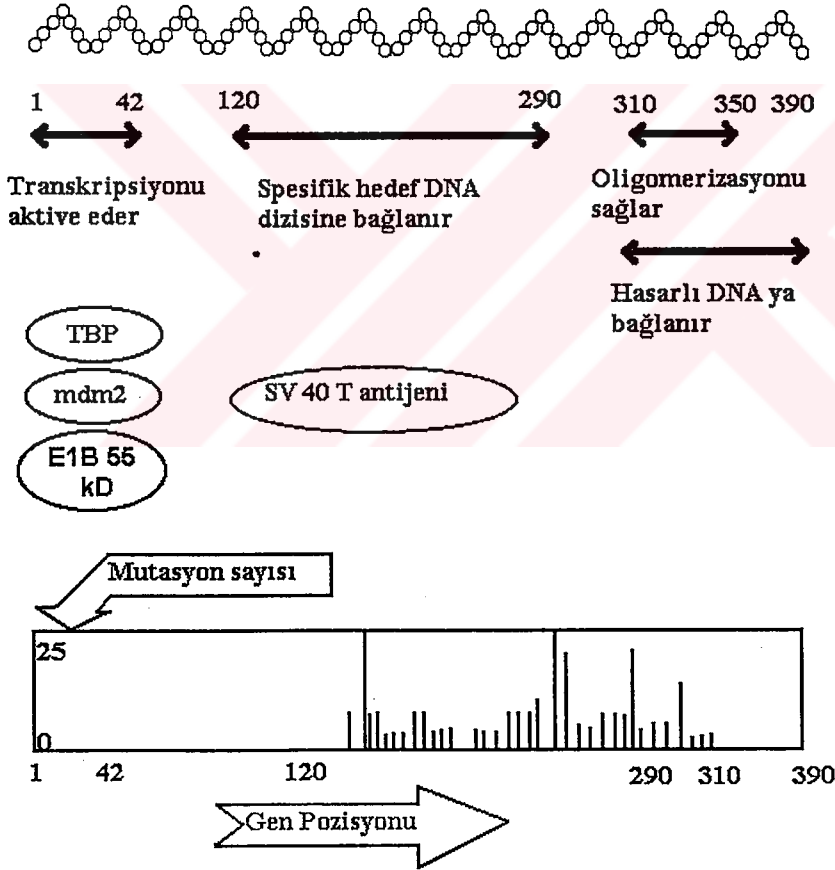
Tüm normal hücreler, düşük seviyelerde p53'e sahiptir. Büyük çoğunlukla DNA'ya zarar veren radyasyon ve benzeri diğer uygulamalarla p53 geni aktive olur ve bunun sonucunda p53 miktarında artış olur.

p53 ün aktivasyonu ile 2 tip olay tetiklenir: (1)Büyümenin durdurulması ve (2)apoptoz (hücre ölümü). Sonuç hücrenin hangi evrede olduğuna bağlıdır. G1 evresinin başlarında, p53, hücre döngüsünün ilerlemesini bloke eden bir kontrol noktasını tetikler. Bu kontrol noktası bir cdk (siklin bağlı kinaz) inhibitörü olan p21'i uyararak çalışır. Böylece hücre S fazına girmeye çalışırken hasarlı DNA'nın tamir edilmesine de olanak sağlar. Fakat eğer hücre bölünmeye başlamışsa p53 apoptozu tetikler. Tipik olarak apoptoz hücrenin küçük heteropiknotik keselere parçalanması ve nükleer DNA'nın fragmentasyonu ile sonuçlanır. Tek belirleyici, hücre döngüsünün evresi değildir. Ör. Bazı hücre tipleri apoptotik cevabı sergilemeye diğerlerinden daha meyillidir^{6,10}.

DNA hasarı onkogenik yolları aktive edebilir, p53 organizmayı bu sonuçlara karşı korur. Eğer mümkünse DNA hasarının tamirine olanak tanıyan bir kontrol noktası tetiklenir, fakat mümkün değilse hücre ortadan kaldırılır. Şartlara bağlı olarak p53'ün bu yollardan birini nasıl tetiklediğinin moleküler mekanizması bilinmemektedir fakat p53'ün aktivitesinin bu yollara bağlı olduğu anlaşılmıştır.

p53 çeşitli moleküler aktivitelere sahiptir. Şekil 2 bu aktiviteler açısından proteinin her bir domaininin fonksiyonunu özetlemektedir:

- p53, polindromik kesilmiş 10 bç'lik motifleri tanıyan bir DNA-bağlayıcı proteindir. Spesifik hedef diziyeye bağlanabilmeyi merkez domaini sağlar.
- p53, hedef genlerin transkripsiyonunu, bu motifin birçok kopyasını içeren promotorlarına bağlanarak aktive eder. N-terminal bölge transaktivatör domainidir. p53 kendi motifini içermeyen bazı genleri de bilinmeyen bir mekanizma ile baskılar.
- p53, hasarlı DNA'ya da bağlanabilir. C-terminal domaini DNA'daki tek-iplikli bölgeleri tanır.
- p53 bir tetramerdir. C-terminal bölge, oligomerizasyondan sorumludur.



Şekil 2. p53'ün farklı aktivitelerinden farklı domainleri sorumludur. Etkileşime giren proteinler bu domainlere bağlanırlar. İnsan tümörlerindeki mutasyonların çoğu DNA-bağlayıcı merkezi domaine haritalanmıştır¹.

p53 mutasyonları p53 proteininin yarı ömrünü 20 dk. dan birkaç saate uzatabilir ve bir antikora belirlenebilen konformasyonel değişikliklere neden olabilir. Proteinin

nukleustan sitoplazmaya lokalizasyonunu değiştirebilir ve böylece SV40 T antijenine ve DNA'ya bağlanmasını engelleyebilir. Şekil 2'de de görüldüğü gibi mutasyonların büyük bir çoğunluğu DNA-bağlayan merkezi domainde görülmektedir. p53 bir transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon gösterdiği zaman, hedef diziyeye bağlanmak için merkezi domainini kullanır. N-terminal transaktivasyon domaini doğrudan TBP'ye (TATA bağlayıcı protein) bağlanır. Bu bölge p53 ile etkileşime giren diğer proteinlerin de hedef bölgesidir. Bu proteinler arasında hücreyel onkoprotein mdm2 ve adenovirus onkoproteini E1B 55 kD sayılabilir. mdm2 N-terminale bağlanarak transaktivasyonu bloke eder ve böylece p53'ün aktivitesini inhibe eder. p53 mdm2'nin transkripsiyonunu uyarır, bu etkileşim negatif geri besleme ile her iki bileşenin aktivitesini sınırlar. E1B 55 kD ile etkileşim bu adenovirüsün p53'ün aktivitesini bloke etmesini sağlar ve adenovirüsün transforme edici kapasitesi için gereklidir. p53'ün diğer bölgeleri de inhibisyon için hedef bölgeler olabilir; SV40 T antijeni, spesifik DNA-bağlayıcı bölgeye bağlanabilir ve hedef bölgelerin tanınmasını engelleyebilir^{1,2,6,7,10}.

Normalde çok düşük seviyelerde bulunan ve muhtemelen inaktif olan p53 proteininin, hücreler DNA hasarına maruz kaldığında veya anormal bir şekilde bölünmeye başladığında miktarı artar. Bu nedenle p53'e "genom gardiyanı" denir⁶⁵. Radyoterapi ve kemoterapi gibi birçok kanser tedavisi, DNA hasarına cevap olarak hücre intiharını tetikleyerek hücreleri öldürür. Terapiye verilen bu başarılı cevap, tümörde p53'ün mutant olduğu kısımlarda büyük oranda azalmıştır. Bu nedenle bu tümörlerin tedavisi oldukça zordur⁶⁶. p53 ile ilgili bilgilerin, yeni kanser tedavilerini geliştirmek üzere kullanılması hedeflenmektedir. Birçok tümörde, düzenli çalışmayan mutant p53 formları gelişmiştir. En azından test tüpünde bu hasarlı p53'ün tekrar çalışması için yollar bulunmaya başlanmıştır^{67,68,69}. p53'ün yerine geçebilecek veya fonksiyonunu onarabilecek yeni molekülleri keşfetmek için protein kimyasının modern yöntemleri kullanılmaktadır^{70,71}. Bu tarz ajanların keşfi kanserin tedavisi için potansiyel olarak güçlü ve seçici yeni bir yol sunacaktır⁷².

p53 gen ürünü, hem hücre döngüsü ilerlemesini hem de apoptozu düzenler. DNA hasarı sonucu Cdk inhibitörü p21'in transkripsiyonunu aktive eden p53 uyarılır. p21, Cdk/cyclin komplekslerinin genel bir inhibitörüdür ve bir replikasyon yardımcı proteini olan PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ya bağlanarak DNA replikasyonunu inhibe eder. Böylece hücre döngüsünün durdurulması, replike olmadan önce hasarlı DNA'nın onarılması için gerekli zamanı sağlar. p53'ün kaybı, bu şekildeki hasarla uyarılmış hücre döngüsünün durdurulmasını önler ve hücre genomunda genel

bir dengesizliğe sebep olur. Bu tür genetik dengesizlikler kanser hücrelerinin yaygın bir özelliğidir ve tümörün ilerlemesi esnasında onkogenlerde ve tümör süpresör genlerde daha ileri değişimlere eşlik eder².

Hücre döngüsünün durdurulmasına ek olarak, p53, DNA hasarı ile uyarılmış apoptoz için de gereklidir. Tamir edilmemiş DNA hasarı normalde memeli hücrelerinde apoptozu indükler. p53 yokluğunda hücreler, DNA'da hasar yaratan ajanlara cevap olan apoptoza yönelmede başarısız olurlar. Bu başarısızlık bir çok tümörün kemoterapiye olan direncine eşlik eder. Buna ek olarak p53 kaybının, büyüme faktörü ve oksijen yokluğu gibi diğer uyarılarla indüklenmiş apoptoza da engel olduğu düşünülmektedir².

Apoptoz, istenmeyen hasarlı ve tamir edilemeyen hücrelerin ölümü için aktif bir program sağlar. Apoptoz bir çok uyarı ile tetiklenebilir. Bunlardan biri yaygın bir yol olan DNA hasarı ile uyarılmış p53'ün BAX (Bcl-2-associated X protein) sentezini aktive edip, bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma-2 protein) sentezini baskılamasıdır. Sağlıklı hücrelerde mitokondrinin dış membran yüzeyinde bcl-2 proteini sentezlenir ve bu protein, Apaf-1 (apoptosis activating factor) proteinine bağlıdır. Hücre içi herhangi bir hasar, bcl-2'nin Apaf-1'i bırakmasına sebep olur. Bunun üzerine mitokondriden sitokrom-c salınımı başlar. Sitokrom-c ve Apaf-1 kompleksi, kaspaz 9 moleküllerine bağlanır. Sitokrom-c, Apaf-1, kaspaz 9 ve ATP'den oluşan kompleks **apoptozom** olarak adlandırılır. Apoptozomlar sitozolde agregatlar oluşturur. Kaspaz 9, bir düzineden fazla sayıda üyesi olan kaspazlar ailesindedir ve bunların tamamı proteazlardır. Proteinleri özellikle aspartik asit rezidülerinden keserler. Kaspaz 9 bir taraftan proteinleri keserken diğer taraftan da diğer kaspazları aktive eder. Böylece bir dizi ardışık proteolitik aktivite sonucu, sitoplazmadaki yapısal proteinler parçalanır, kromozomal DNA parçalanır ve hücre ölümü gerçekleşir^{9,73,74,75}.

2.2. DÜNYA'DA VE TÜRKİYE'DE KANSER SIKLIĞI

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 5 yaşından sonra, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ilk üç ölüm nedenlerinden birisi kanser olup, tüm ölümlerin %10'unu oluşturmaktadır. Dünyada her yıl 6.4 milyon yeni kanser vakası ortaya çıkmakta ve her yıl 4.8 milyon kişi kanser nedeni ile ölmektedir⁷⁶.

Yıllık kanser insidansı gelişmiş ülkelerde yüzbinde 260 iken gelişmekte olan ülkelerde yüzbinde 102'dir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaşam uzunluğundaki artışlarla birlikte kanser sayısında da artışlar beklenmektedir. Kanser ABD'de kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci en önemli ölüm nedenidir⁷⁷. Bu ülkede yıllık

bir milyondan fazla kanser olgusu teşhis edilmekte ve her yıl 500.000'den fazla Amerikalı kanserden ölmektedir. En yaygın 4 kanser, tüm kanser olgularının yarısından çoğunu oluşturan prostat, meme, akciğer ve kolon/rektum, kanser ölümlerinin yaklaşık %30'undan sorumlu olan en öldürücü kanser formlarıdır² (Çizelge1).

Ülkemizde 1982 yılında kanser, bildirim zorunlu hastalıklar listesine alınmış ve bu bildirim Sağlık Bakanlığı bünyesindeki Kansere Savaş Daire Başkanlığına yapılması istenmiştir. 1991 yılına gelindiğinde halen kanser kayıt merkezlerinin kurulmamış olması gözönüne alınarak 1985-1990 yıllarına ait Türkiye'deki kanser yükünün tahminini çıkarmak üzere Çukurova Üni. Tıp Fak. Patoloji ve Biyoistatistik ABD tarafından bir araştırma yapılmıştır. 1991 yılında Türkiye'de kanser tanısı koyan ve Patoloji servisi olan 16 merkez bu çalışmaya katılmış ve 31950 vaka bildirilmiştir. Olguların %56.6'sı erkek ve %43.4'ü kadındır. Her 20 erkek kanserliye karşın 15 kadın kanserliye rastlanmaktadır.

Çizelge 1. Birleşik Devletlerde en sık rastlanan kanserler

Kanser bölgesi	Yıldaki olgu sayısı ve oranı	Yıldaki ölüm sayısı ve oranı
1.Postat	317.000 (%23)	41.000 (%7.4)
2.Meme	186.000 (%14)	45.000 (%8.1)
3.Akciğer	177.000 (%13)	159.000 (%29)
4.Kolon/rektum	134.000 (%10)	55.000 (%9.9)
5.Limfomalar	60.000 (%4.4)	25.000 (%4.5)
6.Mesane	53.000 (%3.9)	12.000 (%2.2)
7.Uterus	50.000 (%3.7)	11.000 (%2.0)
8.Deri	38.000 (%2.8)	7.000 (%1.3)
9.Böbrek	31.000 (%2.1)	12.000 (%2.2)
10.Ağız boşluğu	29.000 (%2.1)	8.000 (%1.4)
11.Leukemialar	28.000 (%2.1)	21.000 (%3.8)
12.Ovaryum	27.000 (%2.0)	15.000 (% 2.7)
13.Pankreas	26.000 (%1.9)	28.000 (%5.0)
Alt toplam	1.156.000 (%85)	439.000 (% 79)
Tüm bölgeler	1.359.000 (%100)	555.000 (%100)

Kaynak : Amerikan Kansere Topluluğu, Kansere Gerçekleri ve Şekiller 1996.

Erkeklerde deri kanserleri 1985-1990 yıllarında sürekli 1. sırada iken genel olgular içinde oranları 1985'te %31.6, daha sonraki yıllarda ise sürekli düşüş kaydederek %20'lere inmiştir. 2. sırada sindirim sistemi kanserleri, 3. sırada solunum sistemi, 4. sırada ürogenital sistem kanserleri ve 5. sırada da lenfoid ve hemopoetik kanser olguları yer almaktadır.

Kadınlarda meme kanseri oranı sürekli %20'lerde seyrederek, 1985-1987 yılları içinde 2. sırada olan meme kanserleri 1988-1990 yıllarında 1.sıraya yükselmiştir.

Sindirim sistemi kanserlerinin genel kanserler içindeki oranları %12.4 ile %17.9 arasında değişerek sürekli 3. sırada seyretmiştir. Ürogenital kanser olguları 4. sırada olup oranı 1985 te %8.5 iken 1990 da %15.7'ye çıkmıştır. Lenfoid ve hemopoetik kanserler ise 5. sırada yer almakta ve genel içindeki oranları %2.9 ile %5.7 arasında değişmektedir. Solunum sistemi kanserleri 6. sırada olup, 1985 te %1.1 iken 1990 da %2.8'e yükselmiştir. Türkiye'de kadınlarda 16 merkezin tüm kanser olguları içinde korpus uteri kanseri %2.6, over kanseri ise %3.4 oranında gözlenmektedir.

Sağlık Bakanlığı kanser kayıt merkezi olgularının büyük çoğunluğu Marmara bölgesinden bildirilmiş olup erkeklerde solunum sistemi kanserleri genel olgular içinde 1.sırada ve %40, sindirim sistemi kanserleri 2. sırada ve %15.7-18.7, ürogenital kanserler 3. sırada ve %8.6-12.6, lenfoid ve hemopoetik kanser olguları 4. sırada ve %6.8 ile %9.2 arasında değişmektedir.

Sağlık Bakanlığı kanser kayıt merkezinin 1984-1990 yılları olguları arasında kadınlarda ilk beşe giren kanser tipleri şu şekilde sıralanmıştır. Meme kanserleri %24.3-35.5 ile 1. sırada, ürogenital sistem kanserleri %15.3-21.4 ile 2. sırada, sindirim sistemi kanserleri %16.2-19.6 ile 3. sırada, deri kanseri olguları %3.3-12.4 ile 4. sırada ve lenfoid ve hemopoetik kanser olguları %1.7-8.4 ile 5. sırada yer almaktadır.

Ç.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD'nin 1985-1991 yılları olguları arasında tüm jinekolojik kanserlerin %43.3'ü servix, %20.7'si ovaryum ve %15.9'u korpus uteride saptanmıştır⁷⁶.

2.3. OVARYUM KANSERİ

Ovaryum kanseri, Birleşik Devletlerdeki kadınlar arasında kanserden kaynaklanan ölümler arasında 5. sırada yer almaktadır¹⁹. Bu heterojen tümör grubu, seröz, müsinöz, endometriyoid, clear cell ve daha az yaygın olan diğer formlar olmak üzere çeşitli histopatolojik alt grupları içerir. Dişi genital sisteminin diğer organlarından köken alan kanserlerle büyük benzerlik gösterirler. Örneğin, seröz ovaryum kanserleri, fallop tüplerinden köken alan epitelyal tümörlerle morfolojik olarak, müsinöz kanserler endoserviksten köken alanlarla, endometriyoid ovaryum kanserleri endometriyum kanserleriyle benzerlik göstermektedir. Bunlara ek olarak dişi genital sisteminde bulunan fallop tüpleri, endoserviks ve endometriyumun embriyolojik olarak muller kanalından, ovaryumların ise mezonefrik kanaldan kök aldığı düşünülmektedir. Ovaryum epitelyal tümörlerinin histogenezi hala tam olarak aydınlatılmış değildir¹⁹.

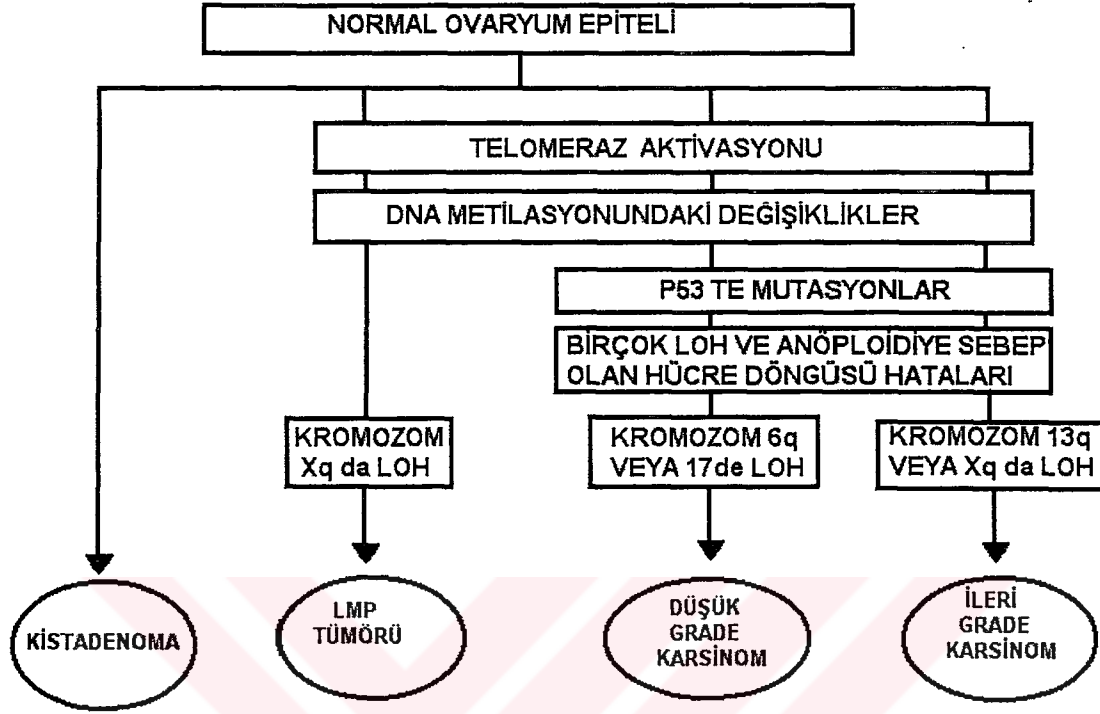
2.3.1. Epitelyal ovaryum tümörlerinin moleküler değişiklikleri

Ovaryum karsinomlarında, HER-2/neu⁷⁸, AKT2⁷⁹, c-fms⁸⁰, Bcl-2³⁸, FGF-3³⁹ ve mei⁸¹ gibi hücrel proto-onkogenlerde ve p53^{28,82,83,84}, SPARC⁸⁵ ve nm23⁸⁶ gibi tümör süpresör genlerde sayısız anomaliler rapor edilmiştir. Her ne kadar ovaryum tümörigenezindeki (tümör oluşumu ve ilerlemesi) esas rolleri halen açık olmasa da ovaryum tümörünün “down regülasyon”unda görev yapan ve tümör süpresörler olarak^{87,88,89} fonksiyon gösteren yeni genler de izole edilmiştir. Çeşitli kromozomlardaki heterozigotluk kaybının sıklığı ile ilgili bilgiler de oldukça fazladır^{21,33,34}. Ayrıca, ovaryum tümörlerinde karşılaştırmalı sitogenetik analizler de rapor edilmiştir.^{22,35,36,37} Spesifik moleküler anomalilerin hastalığın prognozu^{23,38,39,40} ile ilişkili olabileceği gösterilmiş ve HER-2/neu ve p53 gibi spesifik genler de gen terapisi için hedef genler olarak değerlendirilmektedir.

Ovaryum kanserlerinde moleküler genetik değişikliklerin oldukça karmaşık olduğu gözlenmiştir^{21,22,23,24}. Tümör genomundaki spesifik moleküler genetik anomaliler, açık bir şekilde ileri histolojik grade’ler ile ilişkilendirilmiştir^{21,22,23,24,90,91}. 6q, 17p ve 17q gibi bazı kromozomları etkileyen heterozigotluk kaybı ovaryum tümörlerinin tüm histolojik grade’lerinde, kromozom 13’teki kayıplar ise sadece yüksek histolojik grade’lerde görülmektedir. Muhtemelen kromozom 13’te heterozigotluk kaybına uğrayan gen(ler), tümör grade’i ile ilgili belirleyici özelliklerle ilişkilendirilmiş hücrel bir yolu kontrol eder(ler) fakat bu yol, hücre döngüsü regülasyonu ile ilgili değildir^{19,91}.

Son zamanlardaki bilgiler^{21,22}, ovaryum kanserlerini noninvazif ve nonmetastatik ovaryum epitelyal tümörlerinden ayıran, moleküler genetik farklılıklara yeni görüş açısı sağlamıştır (Şekil 3). Farklı tümör alt tiplerinde heterozigotluk kaybının sıklığı ve dağılımı incelendiğinde, ovaryum kanserlerinde sık olan bu kayıpların, biyolojik olarak daha az agresif olan ovaryum epitelyal tümörlerinde daha seyrek olduğu görülmüştür. Yani heterozigotluk kaybına sebep olan defekt, genellikle malignansi ile sonuçlanmaktadır. Bu durum tümör süpresör gen inaktivasyonunun, bu kayıpların önemli bir sonucu olduğunu ve kistadenom veya LMP (Low Malignant Potential) tümör gelişiminin²¹ bir özelliği olmadığını işaret etmektedir. Ovaryum tümörlerinin farklı alttipleri arasındaki moleküler genetik farklılıklar Şekil 3’te özetlenmiştir. Şekil 3’te görüleceği gibi ileri grade karsinom ve düşük grade karsinom gibi malignan tümörlerle güçlü bir ilişkisi olan p53 mutasyonları^{28,29} ve DNA metilasyonundaki değişikliklerin²⁷ LMP tümörleri ve kist adenomlarla ilişkisi yoktur. Ayrıca LMP tümörü ve kanserlerde

ekspres olan ve sınırsız hücre çoğalması için gerekli bir enzim olan telomerazın da kistadenomlarda saptanmadığı görülmüştür²⁶.



Şekil 3. Sporadik (Nonfamilial) ovaryum epitelyal tümör gelişimi için genetik model¹⁹

Heterozigotluk kaybının seyrekliği açısından bir istisna olan LMP tümörlerinde kayıplar olguların %50'sinde²¹ X kromozomunu etkilemektedir. LMP tümörlerinde, bu kromozomu içeren allelik kayıpların hedefi bilinmemektedir. Son zamanlarda aday kromozomal bölge üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır⁹². LOH'un bu kromozomun inaktif kopyasını etkilemesi nedeniyle hedef genlerin X inaktivasyonundan bilinmeyen bir mekanizma ile kaçtığı düşünülmüştür. Bu öneri ilginçtir çünkü tek bir X kromozomu ile doğmuş bireyler (Turner sendromu)⁹³ anormal ovaryum gelişimi sergilerler (gonadal disgenezi). Yani inaktif X kromozomunun varlığı normal ovaryum gelişimi için gereklidir ve yaşamın ergin döneminde aynı gendeki anormalliklerin tümörigeneze sebebiyet verdiği düşünülebilir. İn vitro ölümsüzlüğün sağlanması için de X kromozomunun önemli olduğu düşünülmekte^{94,95} ve son zamanlarda prostat kanseri gelişiminde de bu önem vurgulanmaktadır.

Şekil 3'teki genetik model, yukarıda bahsedilen bütün bu bilgiler temel alınarak çalışılan bir hipotezdir. Ovaryum kistadenomlarının genetik determinantları hakkında bilinenler çok azdır. Bu tümörler malignant formları ile çok az özelliği paylaşıyor gibi

görünmekte ve muhtemelen farklı bir mekanizma ile ortaya çıkmaktadırlar. Buna karşılık telomeraz ekspresyonu²⁶ ve DNA metilasyonundaki global değişiklikler²⁷ gibi bazı moleküler değişiklikler, hem LMP tümörlerinde ve hem de kanserlerde aynıdır. Bu gözlemler, biyolojik olarak daha az agresif olan ovaryum tümörlerinin, klinik olarak benin yerine kistadenomlar ve LMP tümörleri olarak altgruplara ayrılmasının önemini vurgulamaktadır. LMP tümörleri aynı zamanda sık sık X kromozomunun inaktif kopyasının spesifik bir bölgesini hedefleyen heterozigotluk kaybını sergilemektedirler⁹⁵. Spesifik heterozigotluk kayıpları (kromozom 13 veya Xq) hücrel farklılaşma gibi malignan fenotiple özdeşleştirilebilir ve daha yüksek histolojik grade'e sebebiyet verebilir. Buna karşılık kromozom 6q veya 17 deki kayıplar daha kesin olarak malignan fenotiple dolayısıyla yüksek histolojik grade ile ilişkilendirilebilir⁹⁶.

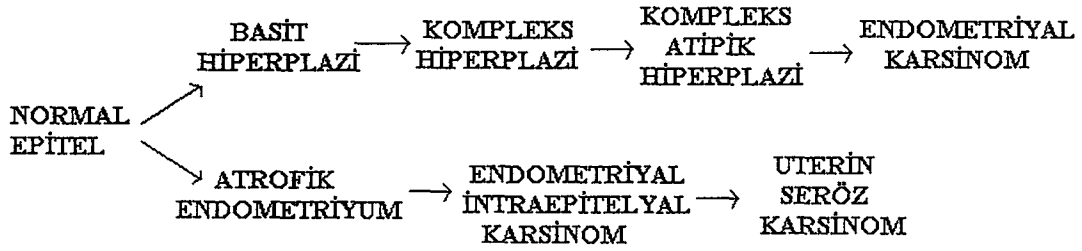
Allelik delesyonun hedefi olan spesifik genlerin işlevlerinden şekil 3'teki modelde bahsedilmiştir, fakat DNA metilasyonu gibi diğer moleküler değişiklikler halen tam olarak bilinmemektedir. Mevcut araştırmalar bu sorulara odaklanmıştır ve muhtemelen yakın gelecekte epitelyal tümörlerin moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Aynı zamanda kadınlardaki bu önemli tümör grubunun klinik idaresini geliştirmeye yönelik yeni tarama, teşhis ve terapötik yaklaşımlar için bir temel sağlayacaktır.

Kohler et al.'ın 1993'te yaptığı bir çalışmada 10 adet 1. evre over tümöründe p53 geninin 5 ve 8. ekzonları arasındaki bölgede yapılan dizi analizi bunların 8'inde, missense mutasyonlar bulunduğunu göstermiştir⁹⁷. Primer over karsinomlu 55 hastanın tümör dokularında p53'ün 5-9. ekzonlarının dizi analizi ile ekzon 9 hariç diğer ekzonlarda 3'ü delesyon, 1'i nonsense ve 12' si missense olmak üzere toplam 16 p53 mutasyonu bulunmuştur⁹⁸ (%29).

2.4. ENDOMETRİYUM KANSERİ

Yılda yaklaşık 150.000 yeni olgu ile endometriyal kanser, dünya çapında kadınlarda kanser nedenleri arasında 5. sıradadır. Birleşik Devletler'de 2000 yılında 36100 yeni olgu ve 6500 ölüm ile dişi genital sisteminin en yaygın malignansisidir. Endometriyal kanser terimi hem malignan epitelyal tümörleri (karsinomları) ve hem de malignan mezenşimal tümörleri (sarkomları) kapsamaktadır. Endometriyal kanserlerin % 95'inden fazlası karsinom olduğundan, endometriyal kanser terimi, literatürde endometriyal karsinomun sinonimi olarak kullanılmaktadır⁴⁶.

Endometriyum uterus boşluğuna bakan ve salgı epiteli ve stromal bileşenlerden oluşan kompleks bir dokudur. Endometriyal kanserler perimenapozal ve postmenapozal kadınlarda ortaya çıkar ve iki kategoriye ayrılır: Genellikle östrojene maruz kalmaya bağlı daha selim yapıdaki **Tip I endometriyal karsinom (endometriyoid karsinomlar)** ların, östrojenin uyarıcı etkisi ile normal epitelden ortaya çıktığı ve histopatolojik olarak tanımlanabilen hiperplazilerin devamı şeklinde geliştiği düşünülmektedir (Şekil 4)⁴⁶.



Şekil 4. İki tip endometriyal kanser tipinin ilerleme modeli.

Tip II endometriyal karsinoma (uterin seröz kanserler), östrojenik uyarımla ilgili değildir, daha yaşlı (ortalama 68) kadınlarda ortaya çıkar ve agresif bir yapı sergiler. Seröz endometriyum kanserlerinin tümü yüksek grade'e sahiptir ve sıklıkla zayıf prognoz sergiler⁹⁹ ve genellikle atrofik endometriyumdan gelişirler (Şekil 4).

Endometriyal kanser tiplerinin yeterince tanınmamasından ötürü endometriyal tümörigeneze dahil olan spesifik gen ve genetik lokusların karakterizasyonu ve tanımlanması gerçekleşmemiştir.

2.4.1. Sporadik endometriyal kanserlerin moleküler genetiği

Yayınlanmış bilgiler, p53 mutasyonlarının ~%25'nin CpG dinükleotidlerinde muhtemelen 5-metilsitozinin timine değişimine bağlı *transisyon* şeklinde olduğunu önermektedir¹³. Kohler et al. 1992'de endometriyal kanserde p53 overekspresyonu ve p53 mutasyonları arasındaki ilişkiyi saptamak üzere DNA dizi analizi yapmış ve 8 kanserden p53 overekspresyonu olan 5'inde nokta mutasyonu belirlemiştir. Protein overekspresyonu göstermeyen 3 kanserin dizisi yabancı tip p53 olarak bulunmuştur³⁰. Bu çalışmada, 107 endometriyal kanserde %20 oranında p53 overekspresyonu ve mutasyonu görülmüştür. İleri evre endometriyal kanserlerde anormal p53 ekspresyonu

(%41), uterusu ait kanserlere (%9) oranla daha yaygın bulunmuştur. Bu da p53 mutasyonlarının endometriyal karsinogeneizde nispeten ileri bir evrede gerçekleştiğini işaret etmektedir³⁰.

Endometriyal tümorigeneizde rol oynayan tümör-supresör genlerin bulunduğu gen bölgelerinin lokalizasyonunu belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda şu kromozom bölgelerinde heterozigotluk kaybı belirlenmiştir^{100,101,102,103,104}: 1, 3, 6, 8p, 9p, 10q, 11, 13, 14q, 15, 16q, 17p, 18p, 20, 21 ve 22q. LOH gösteren lokuslardan özellikle önemli olanlar 3p, 10q, 17p ve 18q lokuslarıdır. Bazı aday tümör süpresör genler ve hMLH1 geninin [Kalıtsal nonpolipozis kolorektal kansere (HNPCC: *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*) neden olan 4 DNA mismatch tamir genlerinden biri] bu kromozomda bulunması nedeniyle 3p'deki LOH'un oldukça dikkat çekici olduğu düşünülmüştür. Endometriyal kanserde 3p deki LOH'un hedef gen ve genleri henüz belirlenememiştir. İki farklı araştırmacı grubu 10q bölgesi için %35-40 oranında LOH bildirirken diğer bir araştırmacı grubu ise 10q'da 2 farklı bölgenin LOH'a uğrayabileceğini önermişlerdir^{102,103,104}. Endometriyal kanserlerde 17p'de %9-35, uterin seröz kanserlerde informatif olguların %100'ünde, özellikle 17p13.1 bölgesinde LOH saptanmıştır. Japon kadınlar arasında yapılan 3 çalışmada kromozom 18q'da LOH oranı %33 olarak bulunmuştur^{101,103,105}. Diğer bir çalışmada 14q'daki LOH'un agresif tümör davranışının işareti olabileceği belirtilmiştir.

Endometriyal kanserlerin büyük çoğunluğunun sporadik olduğu, bir kısmının kalıtsal olduğu düşünülmektedir. Endometriyal kanserli bir kadının annesi ve kız kardeşlerinin endometriyal kanser riski kontrole göre 2.7 oranında yüksektir¹⁰⁶. Kalıtsal formdaki endometriyal kanserlerin çoğunluğu HNPCC'li ailelerde görülmüştür. HNPCC otozomal dominant olarak aktarılan bir hastalıktır ve HNPCC'li ailelerin fertleri farklı tipte kanser geliştirme riskine sahiptir¹⁰⁷. HNPCC geni taşıyıcısı kadınlar, genel popülasyonla karşılaştırıldığında endometriyal kanser geliştirme açısından 10 misli daha fazla riske sahiptirler¹⁰⁸. Sporadik endometriyal kanserli kişilerin sadece küçük bir bölümünde, HNPCC'e neden olan 4 DNA mismatch tamir genlerinden birinde mutasyon görülürken, olguların yaklaşık %20 sinde mikrosatellit düzensizliği görülmüştür^{46,109}.

2.5. TÜMÖR DOKULARINDAKİ SİTOGENETİK DEĞİŞİKLİKLER

Sitogenetik analiz, genotip değişikliklerinin tanımlanması için yaygın olarak kullanılan yararlı bir yöntemdir. Somatik hücrelerde oluşan kromozomal değişikliklere sitogenetik anormallikler denir, bu düzensizlikler kromozomların sayısında (sayısal değişim) veya morfolojisinde (yapısal değişim) olabilir⁵⁴. Sitogenetik analizlerle, 3000-5000 kb dan daha büyük bölgeleri etkileyen değişimler belirlenebilir. Tümörlerdeki görünür sitogenetik değişiklikler iki geniş kategoriye ve çeşitli alt kategorilere ayrılabilir: (1)Translokasyon, inversiyon, delesyon, insersiyon, amplifikasyon ve frajiliteler şeklindeki yapısal anomaliler, (2)Kromozomların tamamına ilave veya kayıplar şeklinde olan sayısal düzensizlikler. Yapısal anomaliler kırılma noktalarındaki genleri değiştirebilir veya miktarlarını etkileyebilir⁵⁴. Onkogenler ile yakın ilişkisi olduğu saptanan kromozomal **frajil bölgeler**, kromozomun bir ya da iki kromatidinde ortaya çıkan çoğunlukla boyanmayan gap ya da daha az sıklıkta kırık ve çok nadiren gözlenen delesyonlar şeklinde tanımlanmaktadır⁵⁵. Frajil bölgelerin görünümü gap, kırık, kopmuş kromozomlar, asentrik fragmanlar ve tri veya quadriradyal şekillerde olabilir. Populasyondaki sıklıklarına göre iki majör grup belirlenmiştir:

- Nadir gözlenen ya da kalıtsal frajil bölgeler (h-fra)
- Sık gözlenen ya da common frajil bölgeler (c-fra)

“Common”, “hot points” ve “otozomal lezyon” terimleri de c-fra bölgeleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Folik asit, timidin eksikliği ve kültüre eklenecek indüktörlerin varlığında frajil bölgeler ortaya çıkabilir. Kırılma bölgelerinde bulunan genlerin, tümörigenezde rol oynayabileceği, son zamanlarda elde edilen deneysel verilerle belirlenmiştir. Bugüne kadar 120 dolayında frajil bölge tanımlanmıştır^{55,110,111}. Oluşum mekanizmaları henüz tam olarak açık değildir. Folata duyarlı ve nadir gözlenen frajil bölgeler, normal allellerinden uzun CCG tekrarlarını içermektedir. Frajil bölge ekspresyonunun gerçekleşmesinde geciken replikasyon ve tamamlanamayan kromozom kondensasyonunun rol oynadığı yapılan DNA replikasyon çalışmalarında gösterilmiştir.

Frajil bölgenin ortaya çıkışı iki aşamada olmaktadır. **İlk aşama**; hücre siklusunun S fazı boyunca çeşitli etkiler (Timidin eksikliğine bağlı olarak folik asit metabolizmasında meydana gelen değişimler gibi) ile primer frajil bölgenin sahip olduğu DNA tekrar dizilerinin kompozisyonunda farklılıkların oluşmasıdır. **İkinci aşamada** ise etkilenmiş bu frajil bölgeye ait DNA dizisi G₂ fazına girmeden önce tamir edilemezse, bu faza girmesi gecikecek ve dolayısı ile kromatin kondensasyonu

gerçekleşmeyecektir. Böylece fragil bölgelere ait bu DNA dizileri mitozda kromozomlar üzerinde **gap**lerin oluşumuna yol açacaktır.

Ortamda timidin düzeyi düştüğü zaman, replikasyon sırasında urasilin yanlışlıkla DNA'ya girdiği gösterilmiştir. Bu bulgu folata duyarlı fragil bölgelerin kromozom kondensasyonunda işe karışan, iskelet proteinine bağlanan kromozom bölgelerindeki kalıtsal DNA metilasyon düzensizliklerine bağlı olarak ortaya çıktığını göstermiştir.

Kromozomların yapı ve fonksiyonlarının heterojen olması çeşitli boyama teknikleri ile elde edilen özel bant biçimini oluşturur. En yaygın boyama teknikleri G (Giemsa), R (Reverse), Q (Quinacrine), T (Telomer) ve C (Sentromer) olup bu tekniklerle elde edilen bantlar birbiri ile ilişkilidir. Ocak-2001 tarihli insan genom bilgileri, herbir kromozomal banta haritalanmış genler açısından 400 bant çözünürlük seviyesinde araştırılmıştır. Bantlara haritalanmış 5000 genin %81'i G-negatif bantlarda lokalizedir. Bu oran insan genomunun hemen hemen yarısını oluşturmaktadır. G-pozitif bantlar, AT oranı yüksek olan ve Tripsinin proteolitik aktivitesinden sonra Giemsa boyası ile boyanan; G-negatif bantlar ise boyanmayan ökromatik kromozomal bölgelerdir. Q bantlama, G bantlamaya çok benzer. R ve T bantları G ve Q bantlara ters boyanma gösterir, GC oranı yüksektir ve G- negatif bantlar olarak tanımlanır. İnsan genomunun L1, L2, H1, H2, H3 izokorları (isochores) ve "flavors mozayigi" olduğu düşünülmektedir. L1 ve L2 izokorları GC oranı düşük; H1, H2 ve H3 izokorları ise GC oranı yüksek aileleri tanımlamak için kullanılmıştır. Farklı bir görüşe göre de G- negatif bantlar, GC ve Alu tekrarlarının yoğunluğuna göre "flavors" adı verilen 4 sınıfa (mundane R, vAlu+vGC-, vAlu-vGC+, vAlu+vGC+) ayrılmıştır^{110,111}. Gen oranı en yüksek 30 kromozom bantı Çizelge 2'de listelenmiştir.

2p12 ve 7q35 dışındaki bantların hepsi G-negatif bantlardır. Bu bantların tümü toplam 2707 gen içermektedir. Gen oranı yüksek 30 bant içinde 1p36, 1q21, 1q32, 2p12, 3p21, 7q22, 8q24, 9q34, 11p15, 11q13, 11q23, 12q13, 14q11, 14q32, 16p11, 16p13, 19p13, 20q13, 21q22, 22q11 bölgelerindeki bantlar kanser kırılma noktaları; 1p36, 1q21, 7q22, 8q24, 11p15, 11q13, 11q23, 12q13, 16p13 ve 19p13 olmak üzere 10 bant, kanser kırılma noktaları ve fragil bölgeler olarak değerlendirilmiştir¹¹¹.

Hastanın tedavisi, prognozu ve yaşamı ile markır olarak değerlendirilen sitogenetik değişikliklerin varlığı veya yokluğu arasında bir ilişki olduğu görülmüştür. Bugünkü kanser literatürünün %63'ünü hematolojik kanserler, %10'unu lenfomalar, kalan %27'sini ise solid tümörler oluşturmaktadır. Oysa en sık görülen kanserler solid

tümörlerdir (%90). Oranlardaki bu sapmanın nedeni, solid tümörlerden incelenebilecek kalitede metafaz elde etmedeki teknik güçlüklerdir^{112,113}.

Çizelge 2. İnsan genomundaki gen oranı en yüksek 30 kromozomal bandın sitogenetik özellikleri ve gen içeriği (110 ve 111 nolu kaynaklardan modifiye edilmiştir)

Bant ^a	Boya	Flavor	İzokor	Gen sayısı	Kanser Kırılma Noktası
1p36	R	vAlu+vGC+	H3+	89	X
1q21	R	vAlu+vGC+	H3*	74	X
1q32	R	vAlu+vGC+	H3*	50	X
2p12	G	G	L	93	X
3p21	R	vAlu+vGC+	H3+	71	X
4p16	R	vAlu-vGC+	H3+	34	
6p21	R	vAlu+vGC+	H3+	216	
7q22	R	vAlu+vGC+	H3*	35	X
7q35	G	G	L	92	
8q24	R	vAlu-vGC+	H3+	37	X
9q34	R	vAlu+vGC+	H3+	68	X
11p15	R	vAlu-vGC+	H3+	128	X
11q13	R	vAlu+vGC+	H3+	117	X
11q23	R	vAlu-vGC+	H3*	44	X
12p13	R	Mundane R	H3*	64	
12q13	R	vAlu+vGC+	H3*	53	X
12q24	R	vAlu+vGC+	H3+	46	
14q11	R	Mundane R	H3-	152	X
14q32	R	vAlu-vGC+	H3*	225	X
16p11	R	vAlu+vGC-	H3*	37	X
16p13	R	vAlu+vGC+	H3*	77	X
17p13	R	vAlu+vGC+	H3*	74	
17q21	R	vAlu+vGC+	H3*	56	
17q25	R	vAlu+vGC+	H3+	38	
19p13	R	vAlu+vGC+	H3+	144	X
19q13	R	vAlu+vGC+	H3+	258	
20q13	R	vAlu+vGC+	H3+	48	X
21q22	R	vAlu-vGC+	H3+	88	X
22q11	R	vAlu+vGC+	H3+	157	X
22q13	R	vAlu+vGC+	H3+	42	

^aÇalışmaya dahil edilmediğinden cinsiyet kromozomlarını içermemektedir.

Kanser hücrelerindeki kromozomal düzensizliklerin incelenebilmesi için, bölünmekte olan neoplastik hücrelerin metafaz ya da prometafazda durdurulması, kromozomların iyi bir şekilde yayılması ve boyanabilmesi gerekir. Özellikle solid tümörlerde çoğu zaman metafaz elde etmek zordur. Tümör hücrelerinde hücre döngüsü bozulmuştur ve tümör hücrelerinin in vitro “katlanma zamanı” normal hücrelerden uzun olabilir. Dolayısıyla kültürden hücreler toplanırken kolsemid süresinin normalden uzun olması gerekir. Çoğu zaman tümör kromozomlarının kalitesi de kötüdür ve kaliteli bant elde etmek çok zordur^{113,114,115}.

Rutin sitogenetik incelemelerde en yaygın kullanılan G bantlama yöntemi, kanser sitogenetiğinde de kullanılmaktadır. Klasik bant tekniklerine ilaveten, son yıllarda sitogenetik ve moleküler genetik teknikler arasında köprü kuran iki yeni teknik

geliştirilmiştir: Fluoresan in situ hibridizasyon (FISH) ve karşılaştırmalı genom hibridizasyonu (Comparative Genome Hybridization, CGH). FISH tekniği, fluoresan işaretli problemlerin incelenecek kromozomlarla hibridizasyonuna dayanır. CGH tekniği ise, farklı renklerde fluoresan işaretlenmiş total tümör DNA'sı ile normal referans DNA'sının aynı anda, normal insan metafaz kromozomlarına hibridizasyonuna dayanır. Böylece, tek bir hibridizasyon işlemi sonucunda tümör örneğindeki DNA dizileri ve tekrar sayılarındaki artış ya da azalış tek bir metafaz üzerinde gözlenebilir.

Günümüzde, özellikle solid tümörlerde çok sayıda ve çeşitte yapısal ve/veya sayısal kromozom anomalileri görüldüğü bilinmektedir. Kanserin ilerleme sürecinde hücreler yeni yeni kromozom anomalileri kazanmaya devam ederler. Yani karyotip giderek kompleksleşir. Öyle ki tümör materyalinde elde edilen her hücre farklı bir kromozom yapısında olabilir.

Kanserli hücrede ilk ortaya çıkan ve kanserleşmeye neden olduğu düşünülen kromozom anomalilerine **primer kromozom değişiklikleri**, hücrenin kanserleştikten sonra kazandığı kromozom anomalilerine ise **sekonder kromozom anomalileri** denir. Ancak kromozom anomalilerinin hangisinin primer, hangisinin sekonder olduğunu anlamak kolay olmamaktadır^{116,117,118,119,120}.

Tek bir ata hücreden kaynaklanan hücre popülasyonuna **klon** adı verilir. Aynı ya da yakın ilişkili kromozom anomalileri taşıyan hücrelerin bir klon oluşturdukları kabul edilir. Kanser sitogenetiğinde amaç, kimi zaman çok kalabalık olabilen, birbiriyle ilişkisiz rastgele kromozom anomalilerinin arasından klonal olanları ayırd edebilmektir. Eğer en az iki ayrı hücrede aynı yapısal kromozom anomalisi varsa, buna **klonal değişiklik** denir. Sayısal anomalilerden bir kromozomun artışı yani trizomisi söz konusu ise, en az iki hücrede gözlemek klonal demek için yeterlidir; fakat bir kromozomun kaybına yani monozomisine klonal diyebilmek için en az üç hücrede gözlemek gerekir.

Her kanser için, kanserin gelişimi sırasındaki kromozomal evölüsyonu rastgele değildir. Kromozom anomalileri arasından belirli bir tümör tipine spesifik olan kromozom anomalilerini ayırt etmek mümkündür. Bu spesifik kromozom anomalileri kimi durumlarda hastalığa tanı koymayı kolaylaştırabilir, tümör tiplerinin ayırt edilmesinde bir temel sağlayabilir, hastalığın prognozu hakkında fikir verebilir ve tedavinin yönlendirilmesinde yardımcı olabilirler. Ayrıca yapısal anomalilere sık sık katıldığı saptanan kromozom kırık noktaları da kanserle ilişkili genlerin (onkogen ya da

tümör süpresör genlerin) bulunabileceği yerler olarak, moleküler genetik çalışmalar için hedef bölgeleri oluştururlar^{114,115,116,120}.

Kanserlerde multipolar bölünmeler, endoreduplikasyonlar, endomitozlar, anafazda geri kalan kromozomlar, kromatid köprüleri gibi çok çeşitli mitoz anomalileri gözlenir⁴. Bunlara bağlı olarak kanserli hücrelerin kromozom sayıları haploidi'den oktaploidi'ye hatta daha fazlasına kadar çok değişik ploidi seviyelerinde olabilir. Öploidi, yani kromozom sayısının haploid sayının ($n=23$) tam katları şeklinde artışı ve azalışı çok sık görülebilmektedir. Genel olarak hastalık ilerledikçe öploidi sıklığı artar.

Kanserli hücrelerdeki sitogenetik bulgular moleküler genetik sonuçları açısından değerlendirildiğinde, delesyonlar ya da monozomiler genellikle tümör süpresör genlerin kaybının göstergesi, tekrarlayan trizomiler ya da parsiyel kromozom artışları ise onkogenlerin amplifikasyonunun belirtisi olarak kabul edilir. İzokromozom oluşumu genellikle genetik materyalin hem kaybına hem de artışına yol açar. Dolayısıyla, izokromozom taşıyan tümörlerde hem tümör süpresör genlerin kaybı, hem de onkogen amplifikasyonu kanser gelişim sürecinde rol oynar^{116,121,122}. Gen amplifikasyonları, özellikle solid tümörlerde çok sık meydana gelir. Normalde tek bir kopya halinde bulunan bir gen birkaç kez arttıysa sitogenetik olarak gözlenemez. Fakat bazı durumlarda belirli bazı genler yüzlerce kez artarlar. Amplifikasyonun bu seviyesi sitogenetik olarak **hsr**'ler (homogenously staining regions, homojen boyanan bölgeler) ya da ekstrakromozomal "**double minute**" (**dmin**) kromozomlar olarak gözlenebilir. **dmin**'ler küçük, çift halde bulunan kromatin parçacıklarıdır. Boyutları akrosentrik kromozomların satellitleri kadar küçükten, 17-18. kromozomları kısa kollarına kadar değişik büyüklüklerde olabilir. Genel olarak **dmin** ve **hsr**'ler kötü prognoz habercisidir.

Jinekolojik malignansilere, özellikle ovaryum kanserlerine ait yayınlanmış çalışmalar azdır. Çünkü; (1) Kromozomal çalışmalarda karyotipik analiz için kültürde çoğaltılmış yeterli sayıda tümör hücrelerine gerek vardır. (2) Hastalığın ileri aşaması ile ilişkili kompleks karyotipler, sayısız sekonder değişikliklerin varlığında kritik sitogenetik değişikliği belirlemeyi güçleştirmektedir. Radyasyon ve kemoterapi tedavisi görmüş hastalarda ovaryum tümörigenezine özgü genomik değişikliklerin çözülmesi güçleşmektedir¹¹².

Ovaryum kanseri sitogenetik incelemelerinde 1q1, 1p1, 1p2, 1p3, 1q3, 1q4, 3p1, 6q1, 6p2, 6q2, 7p1, 7p2, 11p1, 11q1, 11q2, 12p1, 12q2, 13p1 ve 19q1 kromozom bölgelerinde kırıklar; trizomi 5, 7, 8, 10 ve del(3)(p13→23), yani 3. kromozomun kısa kolunun (p)13-23. bantlarının arasındaki bölgenin delesyonu saptanmıştır^{112,122,123,124,125}.

17 malignant epitelyal ovaryum tümöründe, trizomi 7 (%82), trizomi 12 (%64), ve trizomi 17 (%29) şeklinde sayısal kromozomal değişikliklere rastlanmıştır¹²⁶.

Tedavi görmemiş 32 hastadan sağlanmış epitelyal ovaryum tümörü ile yapılan bir çalışmada¹¹² sadece 4 normal 46,XX karyotipi tanımlanmıştır. İleri aşama veya az diferansiye tümörlerde kompleks karyotipik morfolojilere rastlanmıştır. Sitogenetik aberasyonlar daha yaygın olarak 1 ve 6. kromozomlarda görülmüştür. Hem metastatik bir LMP tümörü olgusunda ve hem de az diferansiye invazif bir tümörde t(1;6)(p10;p10) görülmüştür. Bu sitogenetik yeniden düzenlenme tümör oluşumu için potansiyel bir erken marker olarak kabul edilebilir¹²³. 14 uterin sarkom örneği ile yapılan bir çalışmada¹²⁷ 10.(%71), 1.(%54), 7.(%46), 11.(%46), 6.(%38), 2,3,14,16 ve 19.(%23) kromozomlarda anormallikler belirlenmiştir. 24 endometriyoid karsinomla yapılan bir CGH çalışmasında yüksek bir kromozom imbalans oranı (tümör başına 5-7 aberasyon) bulunmuştur. Bu aberasyonlar 3q26.1→ter(olguların %50'si), 8q (olguların %33'ü) ve 1q, 2q, 5p, 6p bölgelerinde yüksek oranda amplifikasyon artışı şeklinde gözlenmiştir¹²⁸.

3-GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışmada kullanılan biyolojik materyal, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında kanser tanısı konularak ameliyat edilmiş hastaların ovaryum ve endometriyum kanseri dokularından, bu Anabilim Dalı ile yaptığımız protokol gereği temin edilmiştir. Alınan dokulardan sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalar için ovaryumlar O1, O2, O3... şeklinde, endometriyumlar E1, E2, E3... şeklinde kodlanmıştır. Moleküler çalışmalar için herhangi bir kanser olgusu olmayan normal bir doku örneği kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda 11 ovaryum, 12 endometriyum olmak üzere toplam 23 kanser dokusu kullanılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar aşağıda verilmiştir:

1. Taq polimeraz (Fermentas)
2. Magnezyum klorür ($MgCl_2$) (Fermentas)
3. PCR tamponu (Fermentas)
4. Restriksiyon enzimleri (Roche, Takara, Biolabs, Fermentas)
5. MspI ile kesilmiş pUC19 marker DNA (Fermentas)
6. Primerler (İyontek ve Molbiol)
7. Deoksitriboz trifosfat seti (Roche)
8. Agaroz (Promega)
9. Akrilamid (Sigma)
10. N,N'-Metilen-bis-Akrilamid (Sigma)
11. Amonyum persulfat (Sigma)
12. Saf etanol (Riedel-de Haen)
13. DNA izolasyonu, PCR ve Elektroforez ile ilgili diğer kimyasal maddeler (Sigma ve Merck)
14. Chang tam besiyeri (Irvine Scientific)
15. Ham's F-10 besiyeri (Seromed)
16. Tripsin (Difco Bacto)
17. Tripsin-EDTA (Irvine Scientific)

18. Glasiyel asetik asit (Merck)
19. Metanol (Merck)
20. Giemsa (Merck)
21. Ksilol (Merck)
22. Aseton (Merck)
23. Kolşisin (Seralab)
24. Heparin (Liquemine, Roche)
25. Entellan (Merck)
26. İmmersiyon yağı (Merck)
27. Penisilin-Streptomisin (Gibco BRL)
28. Gentamisin (Sigma)
29. Sodyum klorid (NaCl) (Merck)
30. Potasyum klorid (KCl) (Sigma)
31. Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck)
32. Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck)

Kullanılan başlıca cihazlar ve teknik malzemeler

1. "Thermal cycler" (Eppendorf Mastercycler)
2. Spektrofotometre (Pharmacia-Biotech, Gene Quant)
3. Jel görüntüleme cihazı (Uvitec)
4. Transilüminatör (Vilber Lourmat)
5. Santrifüjler (Soğutmalı, Universal 16R ve Soğutmasız Techne force 16)
6. Su banyoları (Grant)
7. Hassas terazi (Sartorius)
8. pH metre (İnolab)
9. Yatay ve dikey elektroforez tankları (Biogen ve Biolab)
10. Otoklav (Trans)
11. Etüv (Dedeoğlu, Memert)
12. Vorteks (Nüve NM 110)
13. Steril kabin (Kojair KR-125 Safety)
14. Otomatik pipetler (Gilson, Biohit ve Socorex)
15. Deepfreez (Siemens, Bosch)
16. Buzdolabı (Arçelik)
17. CO₂ inkübatörleri (Shell Lab, Model TC2323 ve Sanyo MCO-17AI)

18. İvert mikroskop (Olympus CK40)
19. Sitogenetik incelemede kullanılan mikroskoplar(Olympus BX50 ve Olympus CH20)
20. Steril kültür tüpü (Greiner)
21. Cam pastör pipeti
22. Steril flask, 25 cm² (Nunc)
23. Steril petri kabı (Nunc)
24. İnce uçlu makas
25. Mezür
26. Şale
27. Lam (Rodajlı)
28. Lamel (24X32)
29. Fotoğraf filmi (İlford PANF, 50 ASA'lık)
30. Fotoğraf kağıdı (İlford ilfospeed multigrade fotoğraf kağıdı 4 M.G.1; M 12.7X17.8cm)

Araştırmanın yapıldığı Moleküler Genetik ve Doku Kültürü Laboratuvarları, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalında bulunmaktadır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Moleküler Çalışma Yöntemi

Kadın-Doğum Anabilim Dalından sağlanan örnekler, doku kültürü için küçük bir parçası ayrıldıktan sonra %70'lik alkole alınarak, DNA'sı izole edilmek üzere -20°C'de saklandı. Bu örneklerin yaklaşık 100 miligramından Fenol-Kloroform-İzoamil yöntemi¹²⁹ ve doymuş tuz çözeltisi ile çöktürme yöntemi¹³⁰ kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı.

a) Fenol-Kloroform-İzoamil yöntemi

1. -20°C'de, %70'lik alkolde saklanan DNA'sı izole edilecek dokulardan yaklaşık 100 miligramı bir tüpe alındı ve fizyolojik tampon ile 2 kez yıkandı. Santrifüj edilerek fizyolojik tampon uzaklaştırıldı.
2. Doku parçasının üzerine 500 µl STE (Sitrata Tris EDTA) (EK 1.1) tamponu ilave edildi.
3. Doku ince uçlu bir makas yardımı ile mümkün olduğunca küçük parçalara ayrıldı.
4. Üzerine 25 µl 10 mg/ml Proteinaz K ve 75µl %10'luk SDS (EK 1.2) ilave edildi.
5. Yavaşça karıştırıldı ve 65°C'de 2 saat inkübe edildi.

6. Tüp belli aralıklarla karıştırıldı (Dokunun parçalanma durumuna göre 55°C'de 1 gece de bekletilebilir).
7. Üzerine eşit hacimde (500 µl) PCI (Fenol: Kloroform: İzooamil=25:24:1) çözeltisinden ilave edildi, hafifçe karıştırıldı ve oda ısısında 5 dk bekletildi.
8. 13000 devirde 10 dk santrifüj edildi.
9. Üstteki berrak tabaka bir mikropipet yardımıyla alındı ve temiz bir tüpe aktarıldı (ara fazdaki proteinlerin alınmamasına dikkat edildi)
10. Aktarılan süpernatantın üzerine 1ml saf etanol ilave edildi.
11. 13000 devirde 10 dk santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı.
12. Alkol uzaklaştırıldı ve pelet %70'lik alkol ile 3 kez yıkanarak oda ısısında 10-15 dk kurumaya bırakıldı.
13. Peletin üzerine 100 µl distile su ilave edilerek yeniden çözülmesi sağlandı.
14. DNase inhibisyonu için DNA örnekleri 65-70°C'de 10 dk bekletildi.
15. DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrede ölçüldü (EK 1.3).
16. Elde edilen DNA'lar % 1'lik agaroz jelde konfirme edildi (EK 1.4).

b) Doymuş tuz çözeltisiyle çöktürme yöntemi

1. DNA'sı izole edilecek dokulardan yaklaşık 100 miligramı bir tüpe alındı ve fizyolojik tampon ile 2 kez yıkandı. Santrifüj edilerek fizyolojik tampon uzaklaştırıldı.
2. Doku parçasının üzerine 500 µl TE-9 (pH:9) (EK 1.5) tamponu ilave edildi.
3. Doku ince uçlu bir makas yardımı ile mümkün olduğunca küçük parçalara ayrıldı.
4. Üzerine 25 µl 10 mg/ml Proteinaz K ve 75 µl %10'luk SDS ilave edildi.
5. Yavaşça karıştırıldı ve 65°C'de 2 saat inkübe edildi.
6. Tüp belli aralıklarla karıştırıldı (Dokunun parçalanma durumuna göre 55°C'de 1 gece de bekletilebilir).
7. Üzerine 50-200 µl doymuş (6M) tuz çözeltisinden ilave edildi, hafifçe karıştırıldı (Bulutsu, süt görünümü elde edilmezse bir miktar daha doymuş tuz çözeltisi eklenebilir). Oda ısısında 5 dk boyunca hafifçe karıştırıldı.
8. 13000 devirde 10 dk santrifüj edildi. Bu işlem esnasında proteinler presipite olur.
9. Üstteki berrak tabaka bir mikropipet yardımıyla alındı ve temiz bir tüpe aktarıldı (Çöktürülmüş proteinlerin alınmamasına dikkat edildi).
10. Aktarılan süpernatantın üzerine 1ml (2-2.5 hacim) saf etanol ilave edildi ve DNA oluşumu gözlemlendi.

11. 13000 devirde 10 dk santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı.
12. Alkol uzaklaştırıldı ve pelet %70'lik alkol ile 3 kez yıkanarak oda ısısında 10-15 dk kurumaya bırakıldı.
13. Peletin üzerine 100 µl distile su ilave edilerek yeniden çözülmesi sağlandı.
14. DNase inhibisyonu için DNA örnekleri 65-70°C'de 10 dk bekletildi.
15. DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrede ölçüldü.
16. Elde edilen DNA'lar % 1'lik agaroz jelde konfirme edildi.

c) p53 geni 7. ekzonunun amplifikasyonunda kullanılan primerler:

p53 geni 7. ekzonunun primer dizaynı:

Çalışmamızın başında, p53 genine ait dizi analizi üzerinde 7. ekzonun bulunduğu bölgeyi içerecek şekilde ve primer dizaynı kriterleri dikkate alınarak seçilen primerler kullanılmıştır. İnternet taraması sonucu elde edilen dizi analizi ile 7. ekzonun 110 bç uzunluğunda olduğu belirlendi¹³¹(Çizelge 3). 7. ekzonun kesim sonunda görülebilir bant vermesi için 8. ve 6. ekzonlara doğru intronik bölgelerden de alınarak 351 baz çiftlik bir bölgenin çoğaltılması için aşağıdaki primerler oluşturuldu.

Forward primer(primer A): 5'-CTTGCA GTGAGCTGAGATCAC-3'

Reverse primer(primer B): 5'-AGAAATCGGTAAGAGGTGGGC-3'

Başlangıçta bu primerlerle yapılan PCR da amplifikasyon ürünü elde edilmiş iken bir süre sonra ürün elde edilememiştir. PCR daki başarısızlığa henüz çalışmanın planlanma aşamasında dizaynı yapılan bu primerlerin stabil olmamasının ve zaman içinde degrade olmasının neden olduğu anlaşılmıştır.

Bu nedenle daha sonra Çizelge 3'te yeri gösterilen şu primerler¹³² kullanılmıştır.

P752: Forward primer(sense) : 5'-GCGCACTGGCCTCATCTTGG-3'

P732: Reverse primer(antisense): 5'-AGGGGTCAGCGGCAAGCAGA-3'

Kullanılan bu primerlerle 8. ve 6. ekzona doğru intronik bölgelerden de içerecek şekilde, 216 bç uzunluğunda bir PCR amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. 110 baz çifti uzunluğunda olan 7. ekzon, restriksiyon enzimleri ile kesildiğinde görüntülenmesi zor küçük bantlar vereceğinden, PCR ürününün 216 bç uzunluğunda olmasının kesim sonunda elde edilecek bantların görünür sınırlarda olmasını sağlayacağı düşünülmüştür.

Çizelge 3. İnsan p53 geninin (TP53) ekzon 7 kodlayıcı bölgesi ve seçilen amplifikasyon bölgesi ile primerleri gösteren nükleotid dizisi. Dizide 7. ekzon koyu büyük harflerle, primerler ise altı çizgili ve koyu olarak gösterilmiştir.

Toplam sekans uzunluğu: 20281 bç (5'→3') sense

→ **Genin Başlangıcı**

13801 ctactcggga ggctgaggaa ggagaatgcc gtgaacctgg gcggtggagc ttgcagtgag
13861 ctgagatcac gccactgcac tccagcctgg gcgacagagc gagattccat ctcaaaaaaaaa
13921 aaaaaaaaaag gcctcccctg cttgccacag gtctcccctg ggcgcactgg cctcatcttg

Ekzon 7 nin başlangıcı: kodon 225 (GTT)

↓

13981 ggcctgtggt atctcctagG **TTGGCTCTGA CTGTACCACC ATCCACTACA ACTACATGTG**
14041 **TAACAGTTC** TGCATGGGCG **GCATGAACCG GAGGCCCATC CTCACCATCA TCACACTGGA**
14101 **AGACTCCAG**g tcaggagcca cttgccaccc tgcacactgg cctgctgtgc cccagcctct
14161 gcttgcctgct gaccctctggg cccacctctt accgattttct tccatactac taccatccca

d) p53 geni 7. ekzonunun PCR ile amplifikasyonu

Örneklerimiz için uygun amplifikasyon koşullarının saptanması çeşitli denemelerle belirlendi. Primerlerin ve Taq polimerazın farklı konsantrasyonları yanında PCR programında farklı ısı döngüleri ve yapışma (annealing) ısıları denendi. Her denemede sadece bir değişken dışındakiler sabit tutuldu. Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği koşullar bütün PCR reaksiyonları için kullanıldı (Çizelge 4).

Çizelge 4. Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu

PCR Bileşeni	Final Konsantrasyon	25 µl reaksiyon karışımında miktar
Primer 1 (10 pmol)	10 pmol	1 µl
Primer 2 (10 pmol)	10 pmol	1 µl
MgCl ₂	2.0 mM	2 µl
dNTP	0.2 mM	0.2 µl
Taq Polimeraz	1.25 U	0.25 µl
Genomik DNA	0.5 µg	1 µl
10xPCR tamponu	1xPCR tamponu	2.5 µl
Su		17.05 µl

Optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR reaksiyonundaki ısı döngüleri şu şekilde programlandı:

- 1-Ön denatürasyon: 94°C'de 5 dk
- 2-Denatürasyon : 94°C'de 45 sn
- Yapışma : 60°C'de 45 sn
- Sentez : 72°C'de 45 sn
- Toplam 35 döngü
- 3-Final sentez : 72°C'de 10 dk
- 4- 4°C'de muhafaza

PCR reaksiyonunun hazırlanmasında sırasıyla şu basamaklar izlendi:

- Reaksiyonda kullanılacak DNA'lar ve çözeltiler -20°C 'den alınıp çözdürüldü.
- %70'lik alkolle temizlenmiş laminar flow kabini içinde üzerlerine örnek kodu yazılarak 200 μl 'lik PCR tüpleri hazırlandı.
- Tüm DNA örnekleri ve çözeltiler önce vortekslendi, daha sonra tüpün duvarındaki tüm damlaları toplamak amacıyla kısa bir süre santrifüj edildi.
- Reaksiyon hacmini tamamlamak için steril bidistile su içeren bir ampül kullanıldı.
- PCR mix hazırlamak için 200 μl 'lik bir PCR tüpüne buz üzerinde daha önce hesap edilen miktarlarda 10X tampon, MgCl_2 , primerler, dNTP mix ve Taq polimeraz eklendi.
- Tüp önce vortekslendi, daha sonra kısa bir süre santrifüj edildi.
- Kodlanmış her bir PCR tüpüne önceden hesap edilen miktarda su ve kodunu taşıdıkları DNA eklendi.
- Daha sonra PCR mix tüplere eşit olarak dağıtıldı.
- Böylece tüplerin her birine tüm PCR bileşenleri yani DNA, 10X tampon, MgCl_2 , primerler, dNTP'ler, Taq polimeraz ve su, buz üzerinde eklenmiş oldu.
- Tüpler önce vortekslendi, daha sonra kısa bir süre santrifüj edildi.
- Tüpler önceden programlanmış thermal cycler'a yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı.

Cihaz durduktan sonra PCR amplifikasyon ürününün elde edilip edilmediğini görmek amacıyla, ürünler öncelikle %2.5'lük agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Ürünler, 216 μg uzunluğunda olması beklenen fragmanı belirlemeye olanak verecek bantları içeren marker olan MspI ile kesilmiş pUC18 veya pUC19 ile beraber yürütüldü. Uvitec jel görüntüleme cihazında diskete alınan jel görüntüleri bilgisayar ortamına aktarıldı.

e) RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi ile PCR ürünlerinin kesimi

PCR ürünü içinde literatür taraması^{133,134,135,136,137} sonucu elde edilen mutasyon noktaları için tanıma dizisi olan endonükleazlar 'restriction mate' programı¹³⁸ kullanılarak belirlendi. Ekzon 7 için normal diziyi kesen fakat mutasyonlu diziyi kesmeyen endonükleazlar ve kesim tripletleri şunlardır:

BspLU11I(triplet 236),
Mae III(triplet 238),
ItaI(triplet 244),
MspI(triplet 248),
HinfI(triplet 259)

PCR amplifikasyon ürünü (7. ekzon), seçilen restriksiyon enzimleri ile kesilerek RFLP analizi uygulanmıştır. Restriksiyon enzimlerinin çalışma sıcaklıkları (EK 1.6) göz önünde bulundurularak uygulanan kesim reaksiyonları Çizelge 5'te gösterilmiştir.

Çizelge 5. p53 geni 7. ekzondaki 5 mutasyona özgü 5 farklı enzim tarafından kesimin gerçekleştiği reaksiyon koşulları

	BspLU11I	Mae III	HinfI	ItaI	MspI
DNA	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Tampon	1 µl	6 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Bidistile su	3.75 µl	-	3.8 µl	3.8 µl	3.8 µl
Enzim	0.25 µl	1.25 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl
Reaksiyon hacmi	10 µl	12.25 µl	10 µl		
Reaksiyon ısısı	48 °C	55 °C	37 °C		
Reaksiyon süresi	1 saat				

Kesim reaksiyonu bileşenleri tüpe Çizelge 5'te belirtilen oranlarda eklendikten sonra, kesim tüpleri, çalışılan enzime uygun olan ısıya ayarlanmış su banyosuna alındı ve 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda enzimin inaktivasyonu için, ısıyla inaktive olanlar 65°C'de 10 dk tutularak, ısıyla inaktive olmayanlar 0.5 µl 0.5 M EDTA (EK 1.7) eklenerek inaktive edildi. Enzim inaktivasyonundan sonra kesimler, jele uygulanan PCR ürününün izlenmesini sağlayan Bromfenol mavisi içeren 6X yükleme tamponu (EK 1.8) ile karıştırılarak poliakrilamid jele uygulamaya hazır hale getirildi. Bunun için 6X yükleme tamponundan 1 µl alınıp 5 µl kesim solüsyonu ile karıştırıldı. Elde edilen ürünler poliakrilamid jelde yürütülerek pUC18 veya pUC19 DNA/MspI marker'i ile ve Çizelge 6'da verilen beklenen bant sayısı ve büyüklükleriyle karşılaştırılarak bilinen p53 mutasyonları araştırıldı.

f) Kesim ürünlerinin poliakrilamit jel elektroforezi (EK 1.9) ve yorumlanması

% 12'lik Poliakrilamit jeli hazırlamak için şu ön hazırlıklar yapıldı:

- %40'lık stok akrilamit çözeltisi hazırlandı.
- % 25'lik Amonium Per Sülfat (APS) çözeltisi taze olarak hazırlandı.
- 5X TBE stok tamponu hazırlanıp otoklavda steril edildi.
- Dikey elektroforez cihazı temizlenip saf sudan geçirildikten sonra, elektroforez camları % 70'lik alkolle silinip kurutuldu.
- Camların arasına sızdırmayı önlemek üzere vazelinlenmiş spacer'lar yerleştirildi.
- Arasına spacer'lar konmuş olan camlar aparata yerleştirildi ve vidaları sıkıştırıldı.
- 12 kuyuluk tarak, % 70'lik alkolle silinerek camların arasına yerleştirildi.

% 12'lik jeli oluşturmak üzere temiz bir kaba:

3.75 ml distile su

2.25 ml %40'lık akrilamit

1.5 ml 5X TBE tamponu

50 µl APS ve

5 µl TEMED eklenerek karıştırıldı.

- TEMED eklendikten sonra poliakrilamit karışımı mümkün olduğunca çabuk enjektöre çekilip, enjektörle camların arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde enjekte edildi. Çünkü TEMED polimerizasyonu başlatıcı katalizör bileşendir.
- Polimerizasyonun gerçekleşmesi için 15-20 dk beklendi.
- Polimerizasyon gerçekleştikten sonra aparat tankın içine yerleştirildi.
- Jelin alt ve üst sınırlarına temas edecek şekilde tanka 1X TBE tamponu eklendi.
- Tampon eklendikten sonra tarak düzgün bir şekilde çekildi.
- Her bir kuyuya, 4 µl yükleme tamponu ile karıştırılmış kesim ürünü uygulandı.
- Kuyulardan birine, kesim bantlarıyla karşılaştırmak için marker (4 µl), birine de, kesim sonucu oluşan bantların kesilip kesilmediğini kontrol etmek amacıyla PCR ürünü uygulandı.
- Tankın kapağı kapatıldı, güç kaynağı çalıştırıldı ve 2 saat süre ile akım uygulandı.
- Süre sonunda jel, camların arasından alınarak 1XTBE'de 0.5 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış EtBr çözeltisinde 30-45 dk boyandı .
- Boya artıklarının uzaklaştırılması amacı ile jel boya çözeltisinden çıkarılıp saf su içine alındı.

- Bir süre bekletildikten sonra saf sudan alınan jel, Uvitec görüntüleme cihazının içine yerleştirildi ve ekrandan izlenerek fokus ayarı yapıldı.
- Görüntü istenen özellikte ise yani kesim ve PCR ürünleri temiz ise görüntü diskete aktarıldı. Jel görüntüsü istenen özelliklerde değil ise sorun giderilmeye çalışılarak poliakrilamid jel elektroforezi tekrar edildi.
- Sorun PCR'da ise PCR, kesim reaksiyonunda ise kesim, jel de ise poliakrilamid jel elektroforezi tekrar edildi.
- Jel görüntülerinin yorumlanması, MspI ile kesilmiş pUC18 veya pUC19 marker bantlarıyla kıyaslama yoluyla yapıldı.
- PCR ürünümüzün ve kesim sonucunda oluşan parçaların, Çizelge 6'da gösterilen beklenen büyüklükleri marker ile karşılaştırıldı. Böylece örneklerimizin normal veya mutant olduğuna karar verildi.

Çizelge 6. 7. ekzondaki 5 mutasyonun normal ve mutasyonlu dizideki bant sayısı ve uzunluklarının RFLP analizi

TRİPLET	RESTRİKSİYON ENZİMİ	KESTİĞİ DİZİ	FRAGMAN SAYISI	FRAGMAN UZUNLUKLARI	KESİM SAYISI
238	MaeIII /GTNAC	Normal	2	138,78	1
		Mutant	1	216	0
244	ItaI GC/NGC	Normal	3	107,98,11	2
		Mutant	2	205,11	1
248	MspI C/CGG	Normal	2	108,108	1
		Mutant	1	216	0
259	HinfI G/ANTC	Normal	2	141,75	1
		Mutant	1	216	0
236	BspLU1II A/CATGT	Normal	2	143,73	1
		Mutant	1	216	0

3.2.2. Doku Kültürü ve Sitogenetik çalışma için kullanılan yöntem

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalından sağlanan kanserli dokular antibiyotikli (%2.5) yıkama besiyeri (EK 2.1) içinde taşınarak steril şartlarda doku kültürü yapıldı. Tümör örneklerinin doku kültürü, laboratuvarında laminar flow kabini içerisinde aseptik çalışma koşullarına uygun olarak yapıldı. Doku kültürünün yapılmasında ve metafaz alanı eldesi aşamalarında standart tekniklerden yararlanıldı¹³⁹.

Kültürün yapılması

1. Yıkama besiyeri içinde gelen doku, laminar flow kabini içinde steril petri kabına alındı.
2. Doku, steril makas ve bistüri yardımı ile yağlarından arındırıldı ve 2 kez yıkama besiyeri ile yıkandı.
3. Üçüncü kez yıkamada besiyerinde 5 dk. bekletildi.
4. Bu yıkama işlemi (3. basamak) 2 kez tekrar edildi.
5. Doku en son Tripsin-EDTA ile yıkandı; dokunun üzerine 1 ml Tripsin – EDTA eklendi ve steril bistüri yardımı ile oldukça küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra dokunun büyüklüğüne göre üzerine 1-2 ml daha Tripsin-EDTA ilave edildi.
6. Tripsin-EDTA ile 37°C'de 30 dk bekletilerek enzimatik yolla hücrelerin dokudan ayrılması sağlandı.
7. Diğer taraftan hücre ekiminde kullanılacak flasklara 2.5 ml besiyeri eklenerek flasklar ekime hazır hale getirildi.
8. Tripsin-EDTA içindeki hücreleri mümkün olduğunca ayrılmış olan doku, invert mikroskopta incelendi.
9. Tripsin-EDTA'lı doku, pastör pipetine çekildi ve 2.5 ml besiyeri (EK 2.2) içeren doku kültürü flasklarına (25 cm²) ekildi.
10. Flaskların (örnek başına iki flask) kapağı gevşek kapatılarak dokunun, 37°C'de, %5 oranında CO₂ içeren inkübatörde açık sistemle kültürü yapıldı.
11. 3-4 gün aralıklarla besiyeri değişimi yapıldı.
12. Kültür süresi 6-11 gün arasında değişti.

Metafaz alanlarının eldesi (Hasat)

1. Yeterli miktarda mitotik hücre yoğunluğu gözlenen flaskların tüm besiyeri hasattan 1 gün önce değiştirildi.
2. Ertesi sabah saat 10⁰⁰ da flasklara 0.04 mg/ml oranında kolşisin damlatıldı.
3. Kolşisin ile 4 saatlik inkübasyondan sonra flaskın içeriği bir santrifüj tüpüne aktarıldı.
4. Flaska 1 ml Tripsin-EDTA eklendi, kısa bir yıkamadan sonra içeriği pastör pipeti ile aynı santrifüj tüpüne aktarıldı.
5. Flaska tekrar 1 ml Tripsin-EDTA eklendi ve kapak sıkıca kapatılarak 37°C'de 3 dk inkübe edildi.

6. Süre sonunda invert mikroskopta hücrelerin flasktan sökülüp sökülmediği kontrol edildi.
7. Tabandan sökülmeyen hücrelerin fazla olduğu durumlarda 1 ml daha Tripsin-EDTA eklenerek flask 37°C'de bir süre daha bekletildi.
8. Yeterince hücre söküldüğü zaman flaska 3 ml yıkama besiyeri eklenerek Tripsin aktivitesi durduruldu (besiyeri anti-Tripsin aktivitesine sahiptir).
9. Flaskın içeriği santrifüj tüpüne aktarıldı.
10. Tüpler 1300 devirde 8 dk santrifüj edildi.
11. Santrifüjden sonra dipteki hücre peletinin üzerinde 0.5 – 0.75 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldı. Pelet hafif parmak vuruşları ile bu sıvı içinde homojen bir şekilde karıştırıldı.
12. Üzerine 5 ml civarında azar azar 0.075 M KCl eklendi (KCl hasattan 1-2 saat önce 37°C'lik etüve alınmalıdır)
13. Tüpler parmak vuruşları ile karıştırıldı (vorteksleme yapılmamalıdır).
14. Hücrelerin şişmesi için 37°C'de 35 dk bekletildi. Bu arada fiksatif (3:1→Metanol:Asetik asit) taze olarak hazırlanıp buzdolabında bekletildi.
15. Süre sonunda tüpe 13 damla fiksatif damlatıldı. Pipet ile karıştırıldı.
16. Tüp santrifüj edildi ve peletin üzerinde 0.5 ml sıvı kalacak şekilde üstteki süpernatant atıldı. Hücre peleti, hücre zarlarının zayıflatılması amacı ile 3 kez 5ml fiksatifle yıkandı. Her bir yıkamada fiksatif tüpe pastör pipeti ile yavaş yavaş eklenerek, pipetajlandı ve santrifüj edildi.
17. Üçüncü yıkamadan sonra hücre peletinin üzerine 0.5 ml süpernatant bırakılıp gerisi atıldı.
18. Hücre peleti pipetajlama ile homojenize edildi ve yayma hazırlamak üzere pastör pipetine çekildi.
19. Temizlendikten sonra buzdolabında metanol veya alkol içinde bekletilmiş soğuk lamalar üzerine 40-50 cm yüksekten 1-2 damla hücre süspansiyonu damlatılarak kromozom preparatları hazırlandı.
20. Preparatlar oda ısısında kurutulduktan sonra 37°C'de 2 gün veya 60°C'de 1 gece bekletilerek yaşlanması sağlandı.
21. Kültürden elde edilen kromozom preparatları solid ve Giemsa (GTG) bantlama yöntemleri ile boyanarak sayısal ve yapısal kromozom anomalileri yönünden tarandı.

GTG Yöntemi (Tripsin ve Giemsa ile G bantlama) ile Preparatların Bantlanması ve Boyanması

2 gün 37°C'de yaşlandırılan preparatlara GTG bantlama yapıldı¹⁴⁰.

- 1.5 ml'lik tripsin stok solüsyonu (EK 3.1) -20°C'den çıkarılıp çözdürülerek bir şale içerisindeki 75 ml % 0.9'luk NaCl (EK 3.2) içerisine eklendi ve pH'sı 7.5-7.8'e ayarlandı.
- İkinci şaleye 75 ml fosfat tamponu (EK 3.3) eklendi.
- Üçüncü şaleye ise 75 ml fosfat tamponu içerisine % 7-10 oranında Giemsa (EK 3.4) eklenerek boya çözeltisi hazırlandı.
- Önce iyi bant elde etmek amacıyla bir-iki preparat 20-90 sn tripsin çözeltisinde tutularak boyandı ve mikroskopta kontrol edildi. Böylece tüm preparatlara uygulanacak en uygun tripsin süresi belirlendi.
- Preparatlar, fosfat tamponunda hafifçe çalkalanarak yıkandı.
- Daha sonra Giemsa boya çözeltisi ile 3-5 dk boyandı.
- Musluk suyundan geçirilen preparatlar havada kurutuldu.
- Bantları boyanmış metafaz kromozomları mikroskop altında sayısal ve yapısal olarak immersiyon yağı kullanılarak 100X objektifle incelendi.
- Kromozomlarda görülen sayısal ve yapısal bozukluklar ile fragil bölgeler Uluslararası İnsan Sitogenetik İsimlendirme Sistemine (ISCN) göre isimlendirilerek kaydedildi.
- Her kanser dokusu için analiz edilebilecek her alan incelendi.
- Preparatlar inceleme sonrası Ksilol'den geçirilerek immersiyon yağından temizlendikten sonra entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.
- Böylece devamlı hale getirilen preparatlar fotoğraf çekimi için saklandı.

Fotoğraflama işlemleri

Kromozom anomalisi saptanan metafaz alanları belirlenip kaydedildikten sonra Leitz Wetzler Orthomat mikroskopta 50 ASA'lık İlford PANF filmi kullanılarak fotoğrafları çekildi. Çekimler 100X büyütmede ve immersiyon yağı altında yapıldı. Fotoğrafların basım işlemleri için İlford ilfospeed multigrade fotoğraf kağıdı kullanıldı.

4. BULGULAR

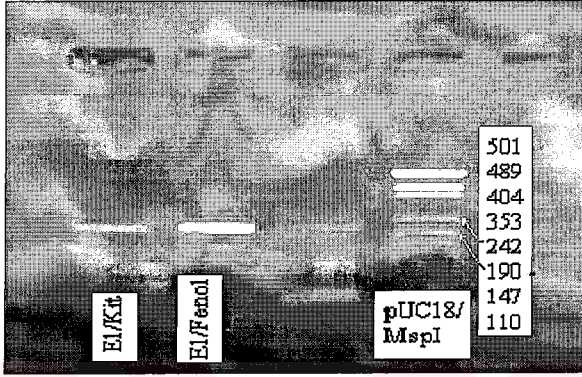
4.1. MOLEKÜLER BULGULAR

Çalışmamızda kanserli ovaryum (11) ve endometriyum (12) olguları ile normal (1) dokudan (Kontrol) izole edilen DNA'lar kullanılmıştır. Bu DNA'ların saflığı ve konsantrasyonu Çizelge 7'de verilmiştir. DNA'lar kullanıma uygun saflık ve konsantrasyonda idi.

Çizelge 7. Ovaryum (11) ve endometriyum (12) dokusu ve normal (1) dokudan (Kontrol) izole edilen DNA'ların saflığı ve konsantrasyonu

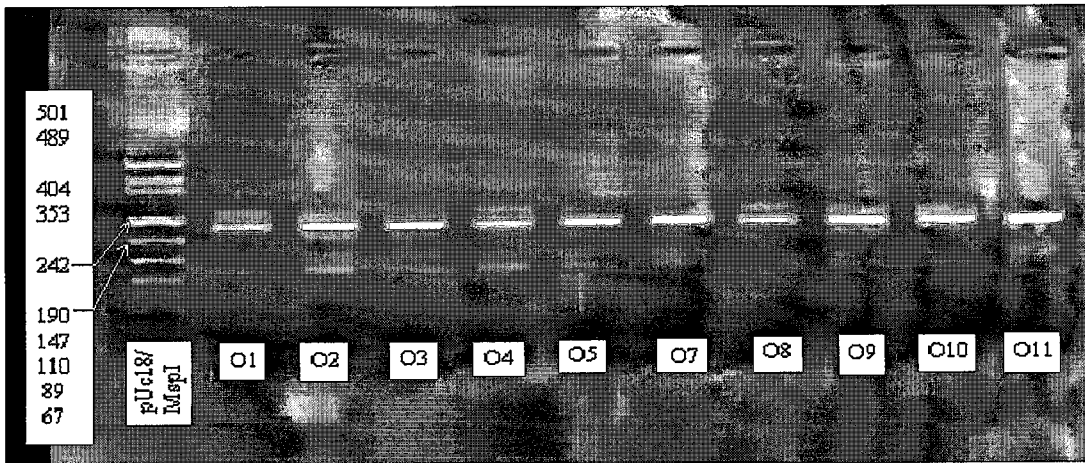
HASTA KODU	R(SAFLIK)	KONSANTRASYON($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
O1	1.8	0.96
O2	1.7	0.29
O3	1.7	2.08
O4	1.8	1.44
O5	1.7	0.22
O6	1.8	1.05
O7	1.8	1.02
O8	1.7	0.52
O9	1.7	2.09
O10	1.7	0.51
O11	2.0	0.2
E1	1.6	1.03
E2	1.7	2.69
E3	1.6	4.27
E4	1.8	1.28
E5	1.7	0.51
E6	1.7	0.75
E7	1.8	0.82
E8	1.8	0.44
E9	1.9	1.16
E10	1.8	4.28
E11	1.7	0.04
E12	1.9	0.98
KONTROL	1.8	1.1

Farklı 2 yöntemle (Fenol-kloroform-izoamil yöntemi ve kitle) E1 örneğinden izole edilen DNA'lardan optimizasyon denemeleri sonucu elde edilen 216 bç. uzunluğundaki amplifikasyon ürünleri Şekil 5'te gösterilmiştir. Bu denemeler sonucu Fenol-kloroform-izoamil yöntemiyle izole edilmiş olan DNA'nın daha kalın ve parlak bir bant verdiği ve PCR'da daha verimli olduğu görülmüştür.

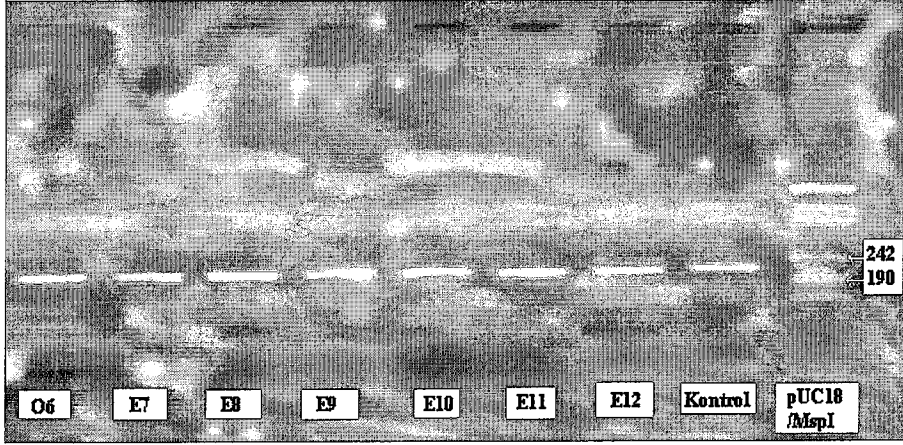


Şekil 5. Farklı 2 yöntemle izole edilen E1 örneği DNA'larından elde edilen 216 bç. uzunluğundaki amplifikasyon ürünü

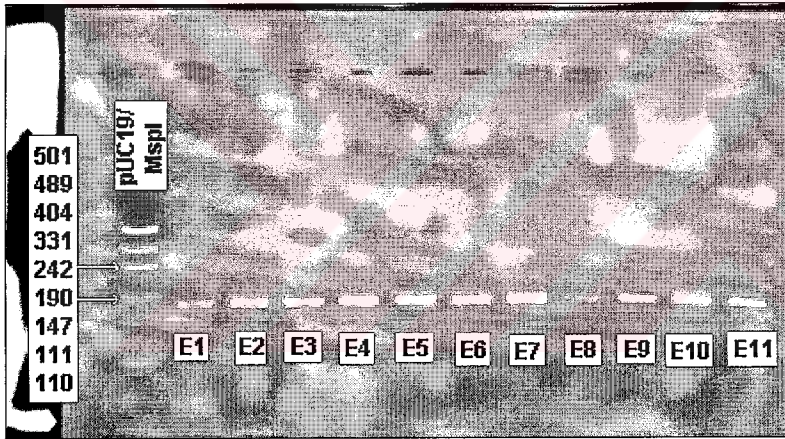
Tüm örneklerden elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri %2.5'luk agaroz jel elektroforezinde 216 bç'lik fragmanı belirlemeye olanak verecek bantları içeren marker ile beraber yürütülmüş ve jel görüntüleri bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Örneklere ait PCR amplifikasyon ürünleri Şekil 6, 7 ve 8'de gösterilmiştir.



Şekil 6. Ovaryum dokularına (O1-O11) ait DNA'ların PCR ürünleri (216 bç)



Şekil 7. Endometriyum (E7-E12) ve ovaryum (O6) dokularına ait DNA'ların PCR ürünleri (216 bç)

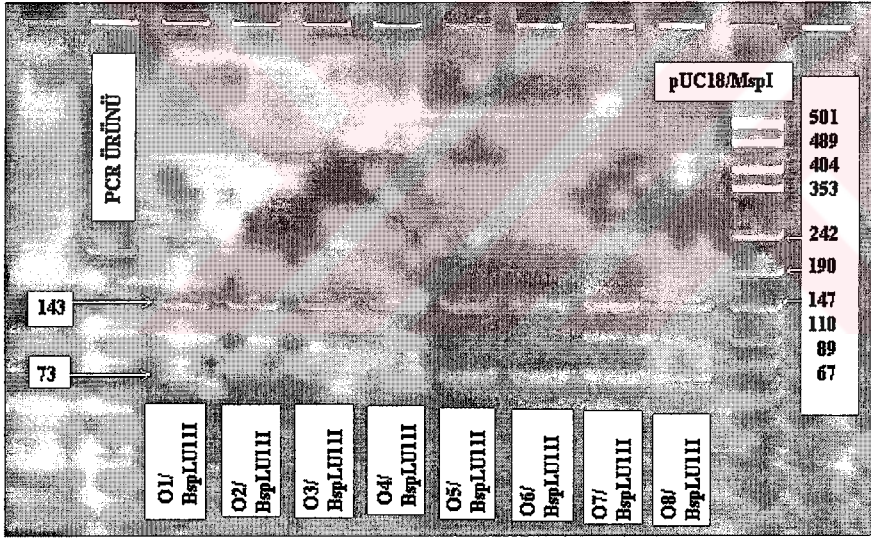


Şekil 8. Endometriyum dokularına ait (E1-E11) DNA'ların PCR ürünleri (216 bç)

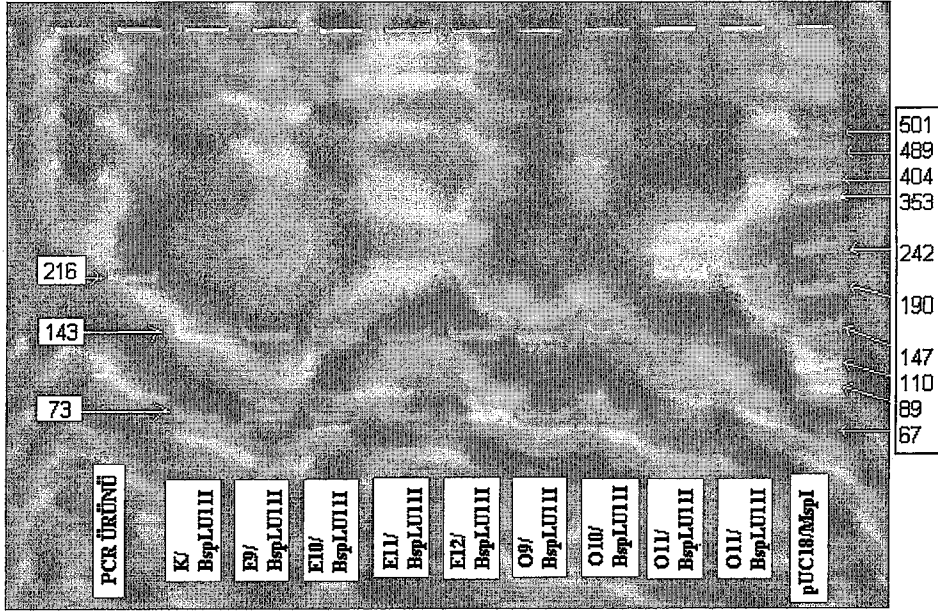
4.1.1. Restriksiyon enzimi Kesimleri

PCR ürünlerinin uygun olduğu belirlendikten sonra tüm örnekler, normal ürünleri belli noktalarda kesme özelliğine sahip olan BspLU11 I, Mae III, Ita I, Msp I ve Hinf I restriksiyon enzimleri ile RFLP analizi için kesilmiştir. Bu kesimlerin poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ve 24'te verilmiştir. Bunlardan sadece Şekil 16'daki %8'lik, diğerleri %12'lik poliakrilamid jel görüntüleridir.

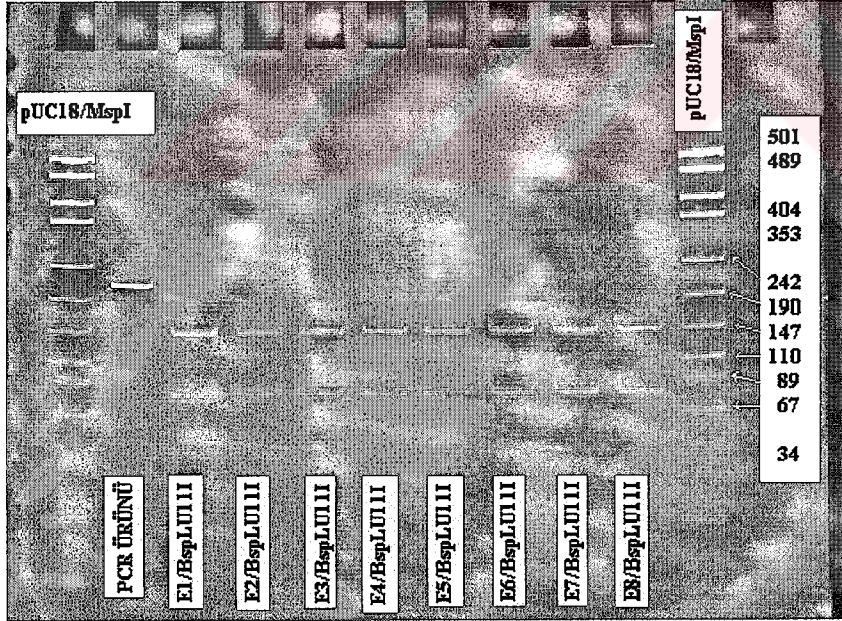
Kanserli ovaryum (O1-11) ve endometriyum (E1-E12) dokusu ile kontrol olarak kullanılan normal bir dokunun PCR ürünlerinin BspLU11I enzimiyle kesilmesi sonucu elde edilen bantların %12'lik poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 9, 10 ve 11'de verilmiştir. Marker DNA ile karşılaştırma yoluyla kesilmemiş PCR ürününün 216 bç, 10 ovaryum, 12 endometriyum kanserli doku ile kontrol dokusunun kesimiyle oluşan 2 bantın 143 ve 73 bç uzunluğunda olduğu görülmüştür. Bu durumda bu örneklerin hepsinin normal diziyeye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Ancak O11 dokusuna ait jel görüntüsü 143 bç ve 73 bç uzunluğundaki bantlarla birlikte kontrol örneğinde gözlenmeyen ve kesilmemiş PCR ürünü ile aynı büyüklükte görünen 3. bir bant görüntüsü daha vermektedir (Şekil 10). Dolayısıyla burada normal dokudan sapma gözlenmektedir. Kesilmiş (normal) ve kesilmemiş (mutant) allellerin her ikisini de içeren bu örnek heterozigot görünümü yansıtmaktadır.



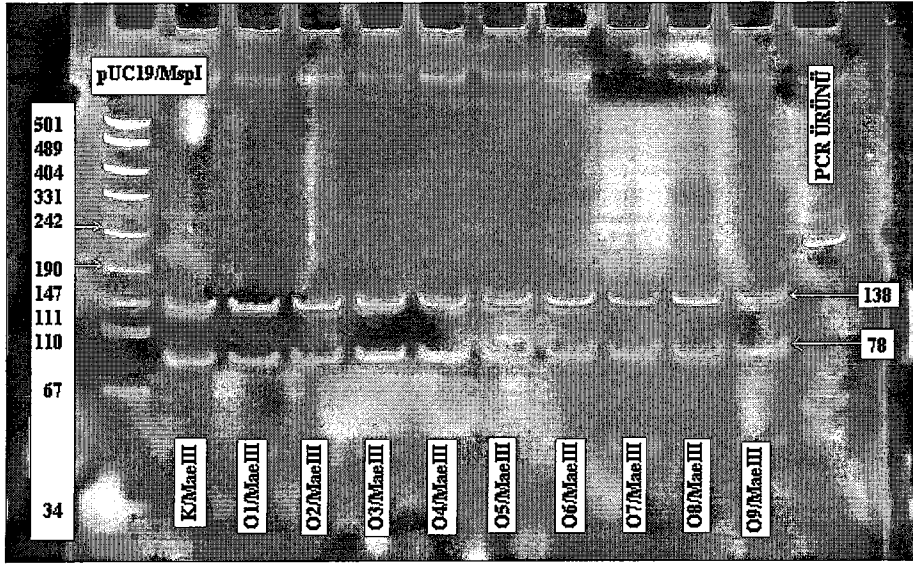
Şekil 9. Ovaryum kanserlerine (O1-O8) ait PCR ürünlerinin BspLU11 I restriksiyon enzimiyle elde edilen kesim ürünleri



Şekil 10. Kontrol doku (K), ovaryum (O9-O11) ve endometriyum (E9-E12) kanserlerine ait PCR ürünlerinin BspLU11 I restriksiyon enzimiyle elde edilen kesim ürünleri

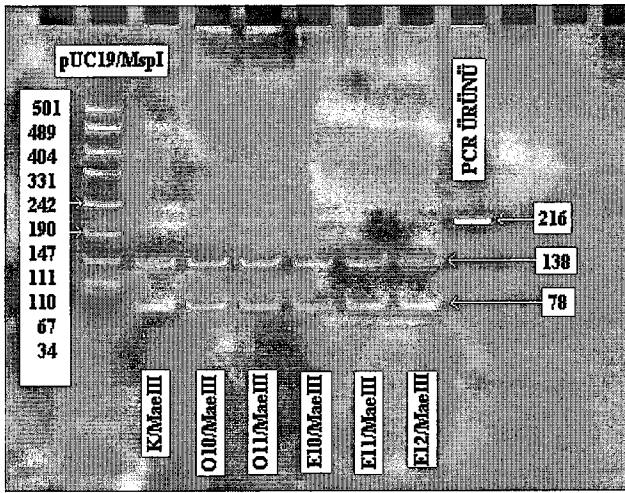


Şekil 11. Endometriyum (E1-E8) kanseri örneklerine ait PCR ürünlerinin BspLU11 I restriksiyon enzimiyle elde edilen kesim ürünleri

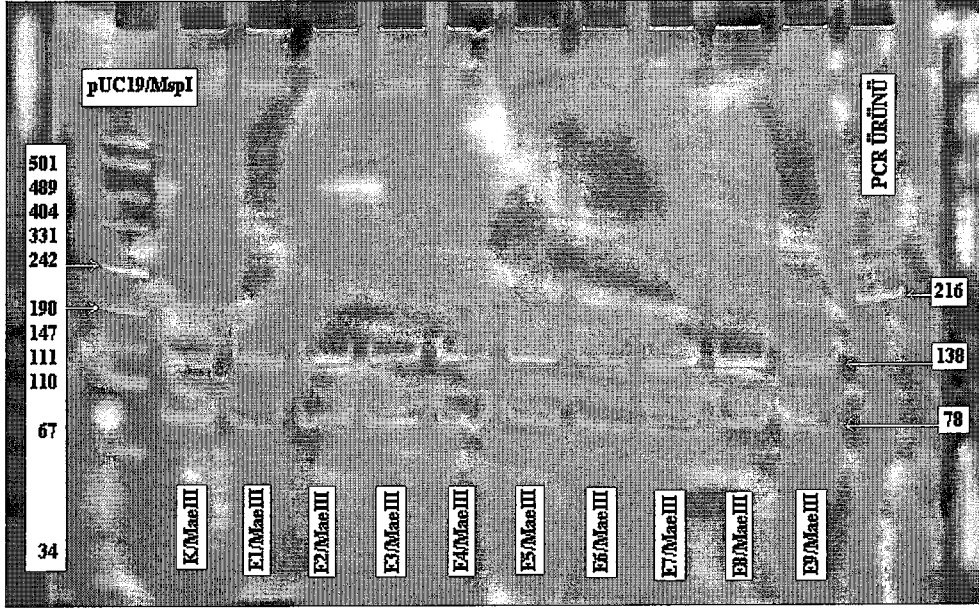


Şekil 12. Ovaryum kanseri (O1-O9) ve kontrol doku (K) örneklerine ait PCR ürünlerinin MaeIII restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri

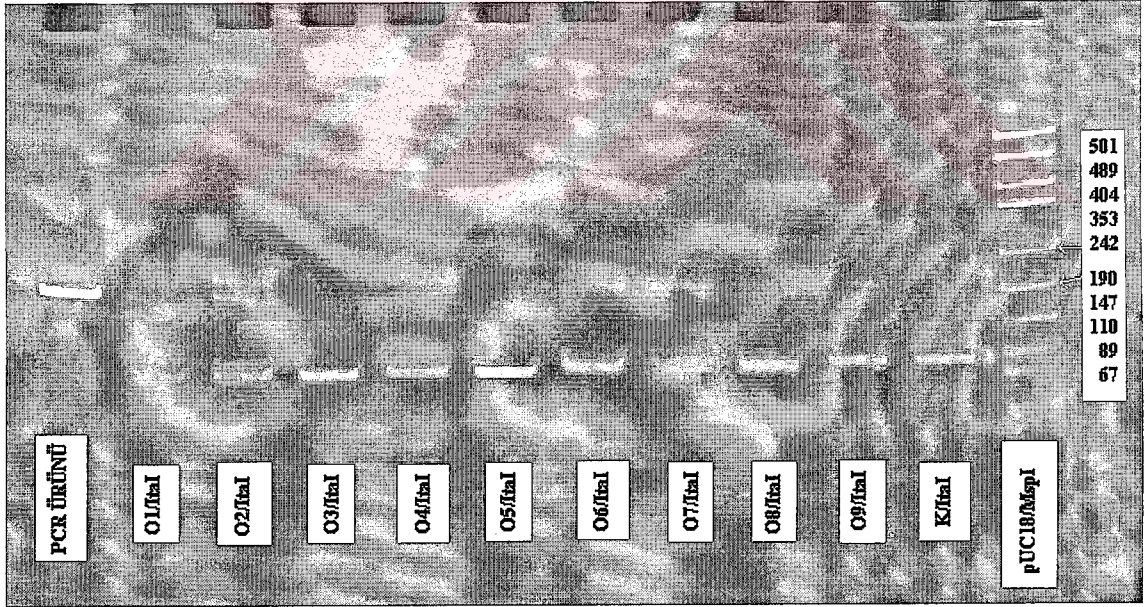
Kanserli ovaryum (11) ve endometriyum (12) örneklerinin Mae III enzimi ile yapılmış olan kesim ürünleri Şekil 12, 13 ve 14'te verilmiştir. Bu enzimle kesilen 23 örnekte iki bant elde edilmiş, bu bantların marker DNA'ya ait bantlarla karşılaştırılmasından 138 ve 78 bp büyüklüğünde oldukları, dolayısıyla normal dokuyu işaret ettikleri anlaşılmıştır. Aynı enzimle kesilen kontrol örneğinde de yine 138 ve 78 bp'lık iki bant elde edilmiştir (Şekil 12, 13).



Şekil 13. Kanserli ovaryum (O10, O11) ve endometriyum dokusu (E10, E11, E12) ile kontrol doku (K) örneğine ait PCR ürünlerinin MaeIII restriksiyon enzimi kesim ürünleri



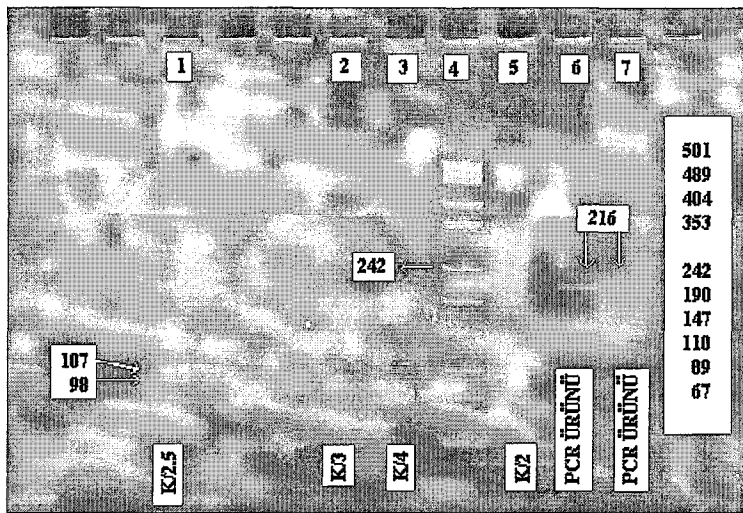
Şekil 14. Kanserli endometriyum örneklerine ait (E1-E9) PCR ürünlerinin MaeIII restriksiyon enzimi kesim ürünleri



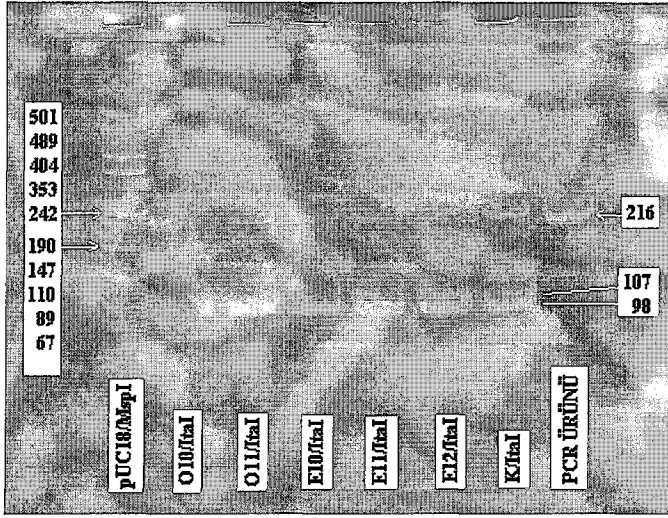
Şekil 15. Kanserli ovaryum (O1-O9) ve kontrol doku (K/ItAI) örneği PCR ürünlerinin ItAI restriksiyon enzimi kesim ürünleri

Ovaryum (O1-O11) ve endometriyum (E1-E12) örneklerinin ItAI enzimi ile yapılmış olan kesim ürünleri Şekil 15, 17 ve 18'de verilmiştir. Ovaryum ve endometriyum kanserli olgulardan elde edilen jel görüntülerinin hepsinde 107 ve 98 bç. bölgesinde kalın bir bantın oluştuğu ve bunun normal kesim bantlarını işaret ettiği

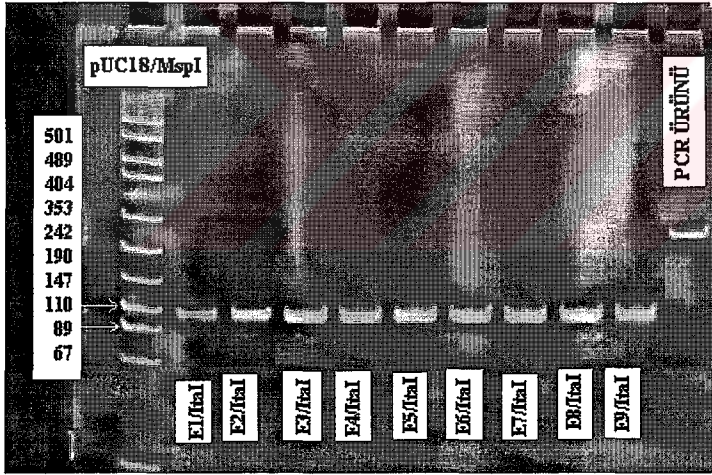
gözlenmiş fakat O1,O2, O6, O7 ve O9 (Şekil 15) örneklerinde ikinci bir bantın bulunduğu, bunun da kesilmemiş PCR örneği ile aynı uzunlukta olduğu gözlenmiştir. BspLU11I enzimi ile kesilmiş O11 olgusunda olduğu gibi kesilmiş (normal) ve kesilmemiş (mutant) allellerin herikisini içeren bu örnekler de heterozigot görünümü sergilemektedir. Halbuki kontrol doku örneğinin aynı enzimle kesimi sonucu sadece 107 ve 98 bç. uzunluğuna uygun tek kalın bir bant görüntüsü verdiği saptanmıştır (Şekil 15). Ita I ile kesilmiş normal dokuda da iki fragman bulunduğu ve bu fragman uzunluklarının 107 ve 98 bç uzunluğunda olduğu bilinmektedir. Ancak burada iki bantın tam olarak ayrılmadığı üstüste gelmiş olduğu ve kalın fakat tek bir bant şeklinde görüldüğü düşünülmektedir. Üstüste geldiği düşünülen bu iki bantı ayırmak için %17 ve %8'lik poliakrilamid jel elektroforezleri kullanıldığında %17'lik jelde iki bantın ayrılmadığı fakat %8'lik jelde belirginleştiği gözlemlendi (Şekil 16). Ayrılmayı gözlemek amacıyla Ita I ile kesilmiş kontrol (normal) dokuya ait PCR ürünleri, %8'lik jelde 1 nolu kuyuya 2.5 µl, 2 nolu kuyuya 3 µl, 3 nolu kuyuya 4 µl ve 5 nolu kuyuya 2 µl olacak şekilde uygulandı. Şekil 16'da görüldüğü gibi, 2 ve 3 nolu kuyulardaki bantların 1 ve 5 nolu kuyulardaki bantlara göre daha parlak olduğu ve marker DNA ile karşılaştırıldığında bu bantların 107 ve 98 bç uzunluğunda oldukları ve birbirinden net olarak ayrıldıkları gözlemlendi. Dolayısıyla %12'lik jelde kalın bir bant şeklindeki görüntününün 107 ve 98 bç'lik iki banttan oluştuğu belirlendi.



Şekil 16. Kontrol (Normal) dokuya ait PCR ürünününün Ita I ile elde edilen iki fragmanın (107 ve 98 bç'lik) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümü



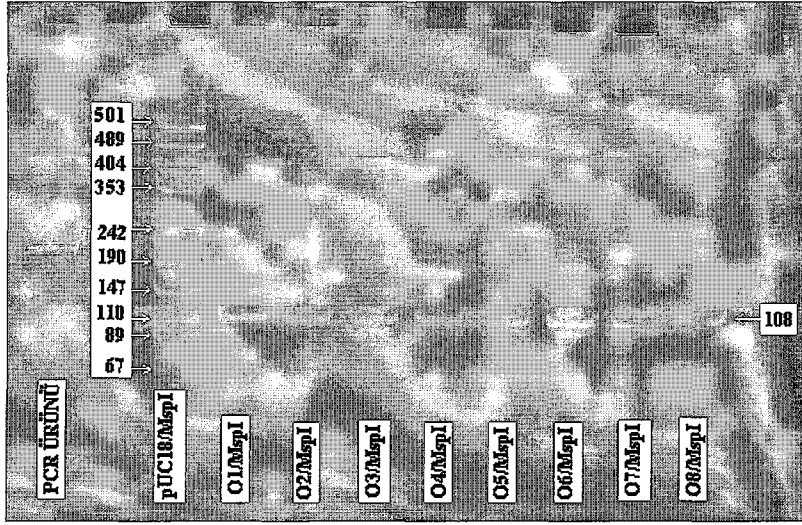
Şekil 17. Ovaryum kanserli 2 (O10, O11) ve endometriyum kanserli 3 (E10-E12) doku ile bir kontrol doku (K/IpaI) örneğinin PCR ürünlerinin IpaI restriksiyon enzimi kesim ürünleri



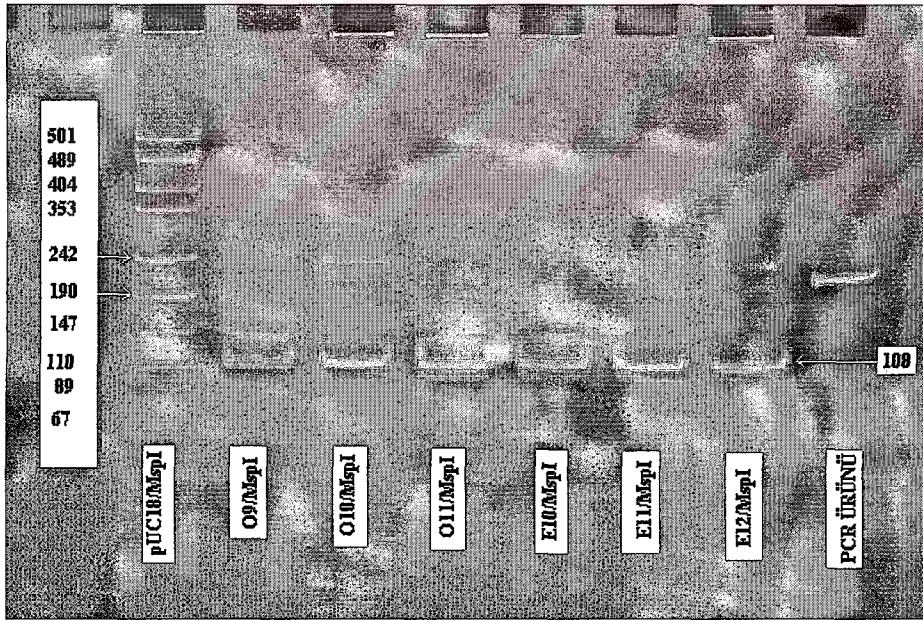
Şekil 18. Kanserli endometriyum (E1-E9) örneklerinin PCR ürünlerinin IpaI restriksiyon enzimi kesim ürünleri

Ovaryum (O1-O11) ve endometriyum örneklerinin (E1-E12) MspI enzimi ile yapılmış olan kesim ürünleri Şekil 19, 20 ve 21'de verilmiştir. Ovaryum ve endometriyum kanserli örneklerden elde edilen PCR ürünleri MspI restriksiyon enzimi ile kesildiğinde elde edilen görüntüler 108 bç. uzunluğunda bir bantın varlığını işaret etmektedir. Halbuki normal dokunun aynı şekilde kesilmesi ile iki fragman elde edildiği ve bu fragmanların uzunluklarının 108 ve 108 bç. uzunluğunda olduğu bilinmektedir.

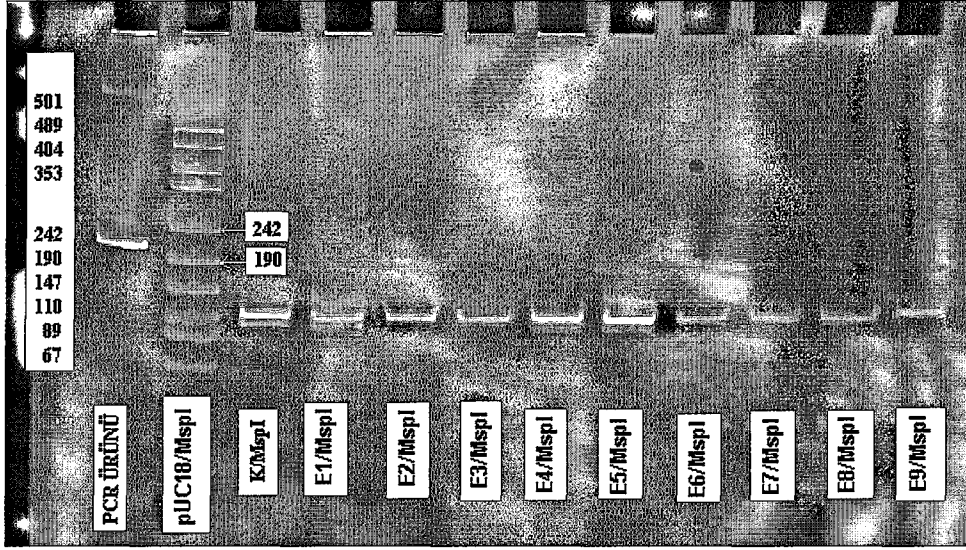
Bu durumda normal dokuda da bir bant gözlenmesi iki fragmanın üstüste gelerek tek bir bant görüntüsü verdiğini düşündürmektedir.



Şekil 19. Ovaryum kanseri (O1-O8) örneklerine ait PCR ürünlerinin MspI restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri

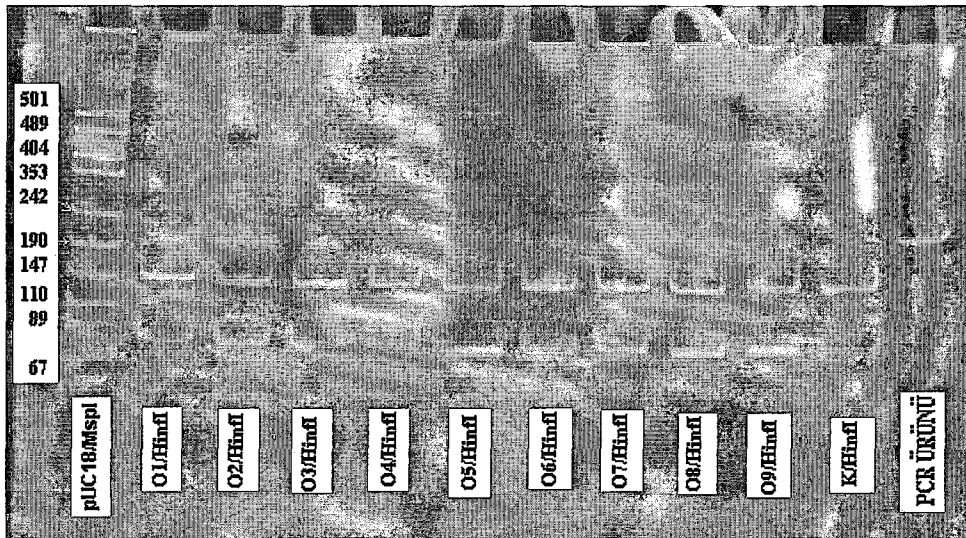


Şekil 20. Ovaryum kanseri (O9-O11) ve endometriyum (E10-E12) kanseri örneklerine ait PCR ürünlerinin MspI restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri

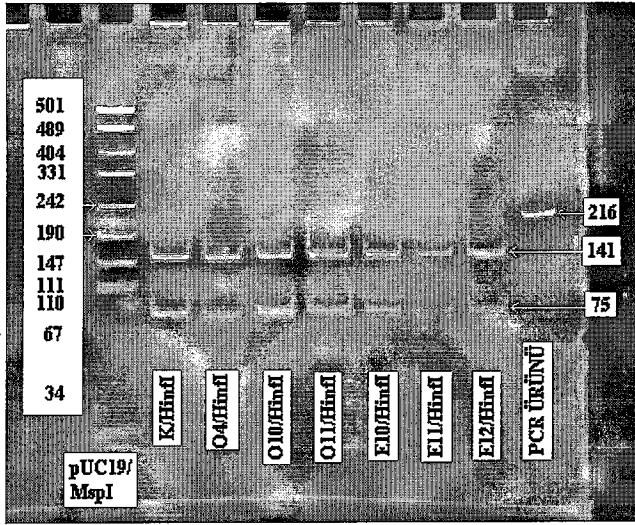


Şekil 21. Endometriyum kanseri (E1-E9) ve kontrol doku (K/MspI) örneklerine ait PCR ürünlerinin MspI restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri

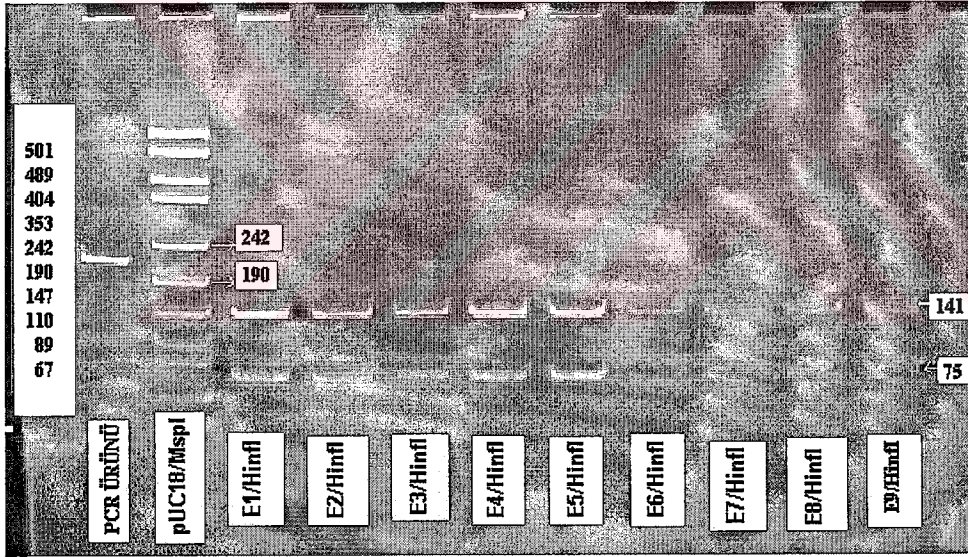
Ovaryum (11) ve endometriyum (12) kanseri örneklerinin Hinf I enzimi ile yapılmış olan kesim ürünleri Şekil 22, 23 ve 24'te verilmiştir. Ovaryum ve endometriyum kanserli örnekten elde edilen PCR ürünleri Hinf I restriksiyon enzimi ile kesildiğinde 141 ve 75 bp uzunluğunda iki bant verdiği saptanmıştır. Kontrol dokunun kesiminde de iki bant oluştuğu ve bu bantların 141 ve 75 bp uzunluğunda olduğu görülmektedir (Şekil 22 ve Şekil 23). Dolayısıyla bu örneklerin normal dokuyu işaret ettiği saptanmıştır.



Şekil 22. Ovaryum kanseri (O1-O9) ve kontrol doku (K/HinfI) örneği PCR ürünlerinin HinfI restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri



Şekil 23. Ovaryum (O4, O10, O11) ve endometriyum kanseri (E10-E12) ile kontrol doku (K/HinfI) örneklerine ait PCR ürünlerinin Hinf I restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri



Şekil 24. Endometriyum kanseri (E1-E9) örneklerine ait PCR ürünlerinin HinfI restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri

Ovaryum (11) ve endometriyum (12) kanseri örneklerinin BspLU11I, Mae III, Ita I, Msp I ve Hinf I enzimleriyle kesimi sonucu gözlenen normal (N) ve heterozigot (H) görünümüler Çizelge 8’de, ovaryum kanserli olgularda gözlenen mutasyonların tümör grade’ine göre sıralanması ise Çizelge 9’da verilmiştir. Çizelge 8’den görüleceği gibi endometriyum ve ovaryum kanseri olgularının BspLU11I enzimiyle kesimi sonucunda yani triplet 236’da 1; ItaI enzimiyle kesimi sonucunda yani triplet 244’te 5 olmak üzere toplam 6 olguda heterozigotluk görülmüştür. MaeIII, MspI ve HinfI

enzimleriyle kesim sonucunda tüm olgularımızda triplet 238, 248 ve 259'da herhangi bir mutasyon saptanmamıştır.

Ovaryum kanserli olgularda triplet 236'daki mutasyon, 11 olguda 1 (%9), triplet 244'teki mutasyon ise 11 olguda 5 (% 45) oranında görüldü. Ovaryum kanserli olgularda triplet 238, 248 ve 259'da; endometriyum olgularında ise çalışılan 5 triplette de mutasyon saptanmadı. Endometriyum kanserli olgularda mutasyon saptanmadığından bu grup için mutasyonların tümör grade'ine göre sıralanmasını gösteren bir tablo yapılmamıştır.

Çizelge 8. 23 kanserli dokuda triplet 236, 238, 244, 248 ve 259'da saptanan mutasyonlar. N; Normal, H; Heterozigot dokuyu işaret etmektedir.

	Triplet 236 BspLU111	Triplet 238 Mae III	Triplet 244 Ita I	Triplet 248 Msp I	Triplet 259 Hinf I
E1	N	N	N	N	N
E2	N	N	N	N	N
E3	N	N	N	N	N
E4	N	N	N	N	N
E5	N	N	N	N	N
E6	N	N	N	N	N
E7	N	N	N	N	N
E8	N	N	N	N	N
E9	N	N	N	N	N
E10	N	N	N	N	N
E11	N	N	N	N	N
E12	N	N	N	N	N
O1	N	N	H	N	N
O2	N	N	H	N	N
O3	N	N	N	N	N
O4	N	N	N	N	N
O5	N	N	N	N	N
O6	N	N	H	N	N
O7	N	N	H	N	N
O8	N	N	N	N	N
O9	N	N	H	N	N
O10	N	N	N	N	N
O11	H	N	N	N	N

Çizelge 9. Ovaryum kanserli olgularda gözlenen mutasyonların tümör grade'ine göre sıralanması. N; normal, H; heterozigot dokuyu işaret etmektedir.

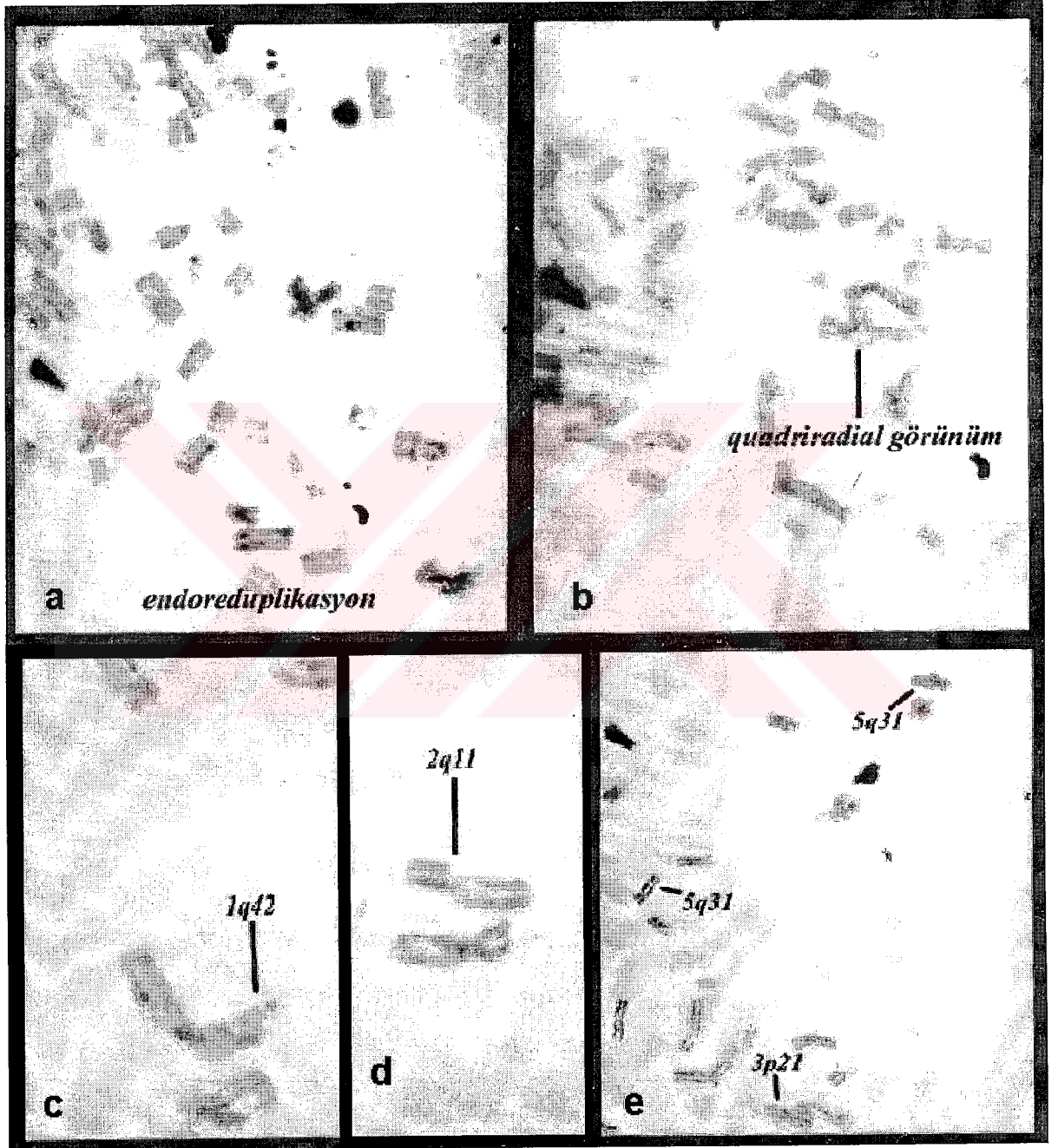
GRADE	OLGU KODU	Triplet 236 BspLU11I	Triplet 238 Mae III	Triplet 244 Ita I	Triplet 248 Msp I	Triplet 259 Hinf I
GRADE 3	O4	N	N	N	N	N
GRADE 2	O1	N	N	H	N	N
	O2	N	N	H	N	N
	O5	N	N	N	N	N
	O8	N	N	N	N	N
	O10	N	N	N	N	N
GRADE 1	O7	N	N	H	N	N
	O9	N	N	H	N	N
	O11	H	N	N	N	N
GRADE'İ BELLİ OLMAYANLAR	O3	N	N	N	N	N
	O6	N	N	H	N	N

4.2. SİTOGENETİK BULGULAR

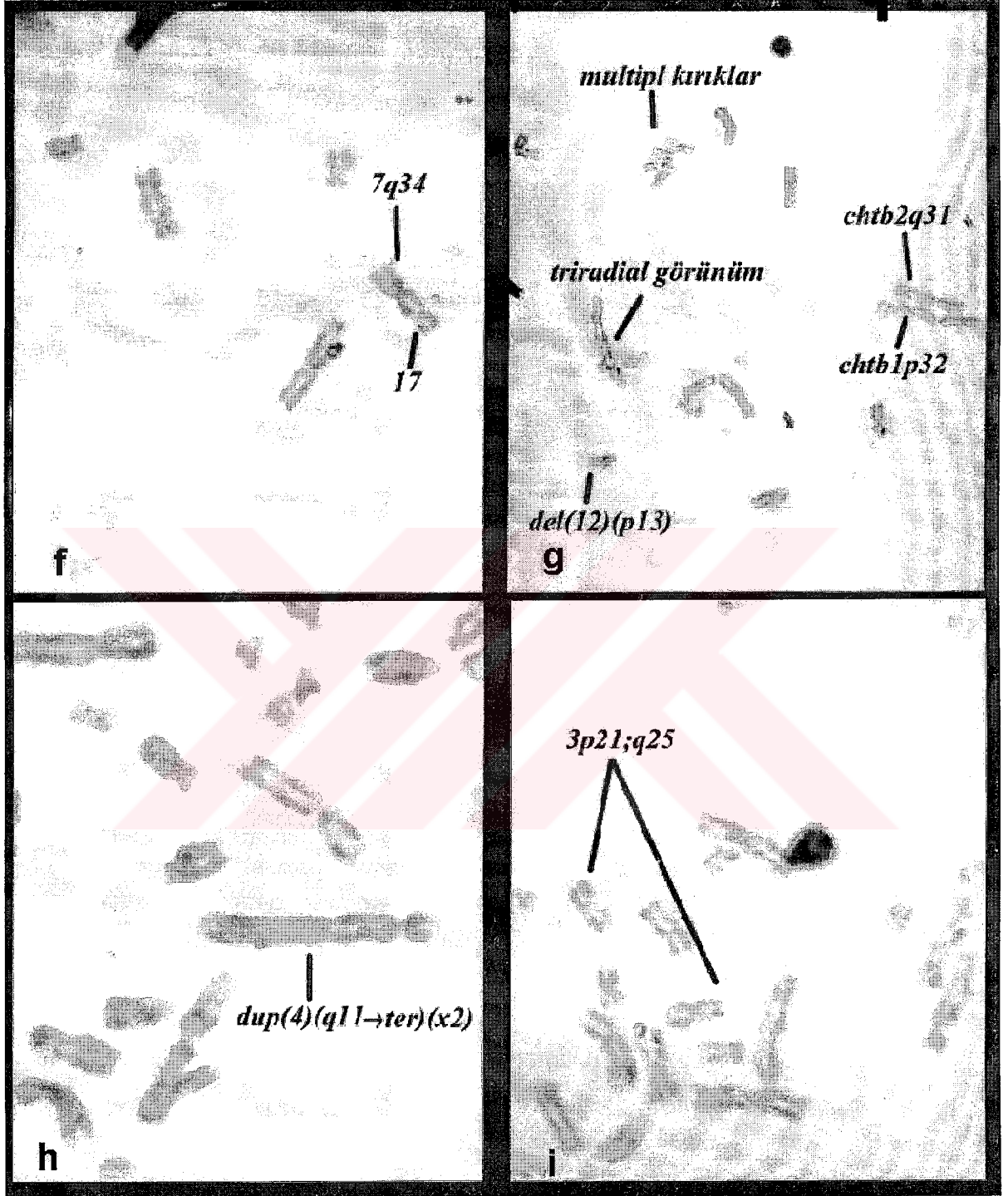
Çalışma süresince toplam 23 olgudan (11 ovaryum ve 12 endometriyum) doku kültürü yapılarak kromozom preparatları elde edilmiş ve sitogenetik analizleri yapılmıştır. Sitogenetik analiz sonuçları ve olguların histopatolojileri Çizelge 10 ve 11'de verilmiştir. İncelenen olguların kromozomlarında görülen düzensizliklere ait bazı fotoğraflar Şekil 25 ve 26'da gösterilmiştir.

Olgulara ait preparatlar, sayısal ve yapısal kromozom anomalileri yönünden incelenmiştir. Yirmiüç olgudan sadece bir olguda (O9) hiçbir kromozom anomalisine rastlanmamıştır. Yirmiiki olguda tespit edilmiş olan başlıca kromozomal düzensizlikler; frajilite, kromatid kırıkları, translokasyon, inversiyon, delesyon ve izokromozom şeklindedir. Çizelge 10'da 11 ovaryum kanseri olgusunun, Çizelge 11'de 12 endometriyum kanseri olgusunun sitogenetik bulguları ve histopatolojik tanıları verilmiştir. Ovaryum kanseri olgularında 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18. kromozomlarda frajil bölge, kırık, delesyon, duplikasyonlar, inversiyon, translokasyon, homojen boyanan bölgeler ve double minute yapılar gözlenmiştir. Ovaryum olgularından over 5'de (O5) bir alanda 1 translokasyon [t(3q;7q)], 35 alanın tümünde 9, 10, 12, 14, 15 ve 20. kromozomlardaki sayısal artışlarla 54,XX karyotipi (11 olguda 1: %9) tespit edilmiştir (Çizelge 10). Endometriyum kanseri olgularında 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 21, 22 ve X kromozomlarında frajil bölgeler, kırıklar, gapler, delesyonlar, inversiyonlar, homojen boyanan bölgeler, endoreduplikasyonlar, radyal görünüm, erken sentromer ayrılmaları, asentrik kromozomlar ve double minute yapılar görülmüştür (Çizelge 11).

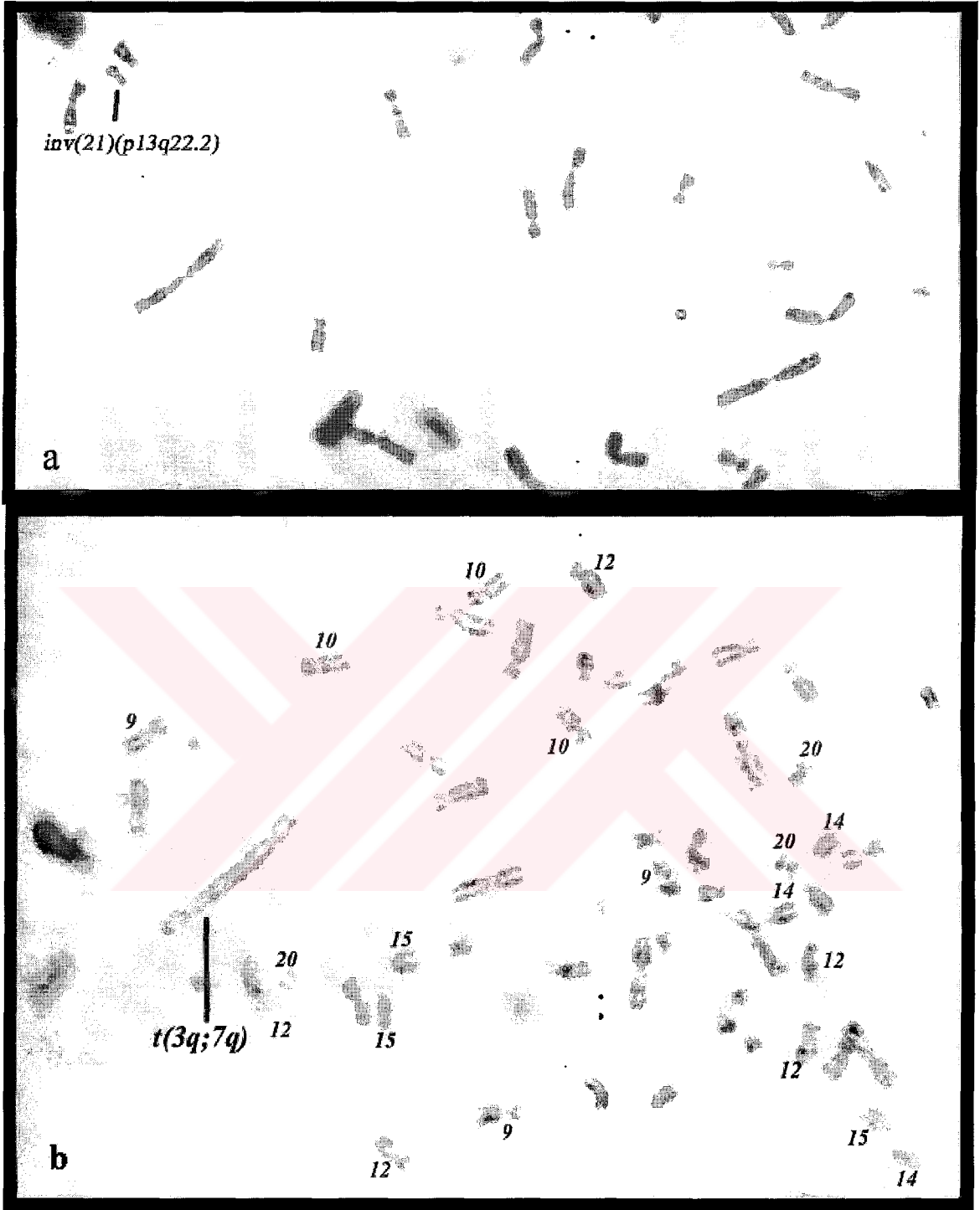
E6 ve O11 olgularının karyotip analizlerinde belirlenmiş olan çeşitli anomaliler Şekil 25'te, E1 olgusunda inv (21)(p13;q22.2) ve O5 olgusunda 54, XX, +9, +10, +12x3, +14, +15, +20 karyotipi Şekil 26'da gösterilmiştir.



Şekil 25. E6'da a) endoreduplikasyon b) quadriradial görünüm c) chtb(1)(q42) d) chtb(2)(q11) e) fra(5)(q31)[2], chtb(3)(p21)



Şekil 25.-f) E6'da $del(7)(q34)+17$ g) E6'da triradial görünüm, $chtb(1)(p32)$, $chtb(2)(q31)$, $del(12)(p13)$ ve multiple kırıklar h) O11'de tüm alanlarda tespit edilen $dup(4)(q11→ter)[2]$ i) E6'da $del(3)(p21,q25)[2]$



Şekil 26. a) E1'de *inv(21)(p13;q22)* b) O5'te 54,XX,+9,+10,+12x3,+14,+15,+20 karyotipi ve *t(3q;7q)*

Çizelge 10. Onbir ovaryum kanseri olgusunun sitogenetik bulguları ve histopatolojik tanıları

HASTA KODU	YAŞI	METAFAZ SAYISI	MODAL SAYI	KROMOZOMAL ANOMALİ	HİSTOPATOLOJİK TANI
O1	69	60	46	fra(1)(q21) fra(1)(q32) chtb(1)(p34) del(2)(q31) fra(2)(q33) fra(3)(p25) fra(3)(q27) chtb(5)(q12) fra(7)(q22) chtb(10)(q22) fra(11)(q23) chtb(12)(q12) fra(14)(q13) fra(14)(q24) chtb(14)(q13) del(18)(q23)	Seröz Papiller Kist Adenokarsinoma, Omentum Metastazı var Grade 2
O2	54	20	46	fra(1)(q21) chtb(4)(q12) chtb(5)(q31) chtb(17)(q24)	Adenokarsinoma (Endometriyoid tip) Grade 2 Evre: 3C
O3	48	35	46	fra(1)(q32) chtb(8)(q21)	Krukenberg tümörü Lenf metastazı
O4	63	10	40-46	chtb(1)(q21) t(22p;1q)	Endometriyoid Karsinom, Grade 3 Evre: 1B
O5	51	35	54	54,XX,+9x3,+10x3,+12x5,+14, +15,+20x3 t(3q;7q)	Seröz Adenokarsinoma Grade 2 Evre: 3C

Çizelge 10- devamı

HASTA KODU	YAŞI	METAFAZ SAYISI	MODAL SAYI	KROMOZOMAL ANOMALİ	HİSTOPATOLOJİK TANI
O6	12	42	42-46	gap(5)(q31)[2]	Endodermal Sinüs tümörü, Evre:3C, Lenf nodu metastazı
O7	28	24	40-46	2qh+ fra(3)(p14)(q12) fra(3)(q11)(p13) fra(3)(p21)(q21)(q28) 9qh+	Seröz, Borderline, Grade 1, Evre: 1C
O8	19	19	43-46	gap(1)(q21)	Granüloza Hücreli tümör, Grade 2, Evre: 3C
O9	54	11	34-46	-	Adenokarsinom Grade 1
O10	48	32	46	2qh+[13]	Seröz papiller Kistadenokarsinom Grade 2, Evre: 3C
O11	48	27	47-77	gap(2)(q23) chtb(3)(p25)[2] chtb(3)(q11) dup(4)(q11→ter)(tüm alanlarda) del(4)(p16→ter) del(5)(p13)[3] del(5)(p15) del(5)(p14) chtb(9)(p22) del(11)(q25→ter) inv(12)(p10-q12)[3] del(13)(p11→ter)[2] del(15)(p11→ter) dup(18)(q11→ter)(tüm alanlarda) double minutex5	Over Ca: Endometriyoid Adenokarsinom Grade 1, Evre 3C End. Ca: Evre: 1B

Çizelge 11. Oniki endometriyum kanseri olgusunun sitogenetik bulguları ve histopatolojik tanıları

HASTA KODU	YAŞI	METAFAZ SAYISI	MODAL SAYI	KROMOZOMAL ANOMALİ	HİSTOPATOLOJİK TANI
E1	66	35	40-79	fra(1)(q11) fra(1)(q32) 2p+[x2] dup(2)(p11-12) fra(3)(p21) fra(5)(q31) fra(7)(q22) fra(9)(q34) fra(11)(q23) inv11(p15.4;q23.1) del(12)(p12) fra(14)(q24) fra(15)(q22) fra(17)(q21) t(19:22)(q13.3;p13) inv (21)(p13;q22.3)[2] t(22:21)(q13;p13)	Adenokarsinoma Grade 3 Evre: 2A
E2	54	26	46	chtb(2)(p13) i(2)(p13) chtb(5)(q31)[3] chtb(7)(q21) del(7)(q34) fra(11)(q24) del(11)(p15) chtb(17)(q21)[7] t(14;21)(q11;q11) fra(X)(q27.3)	Adenokarsinoma Grade 2 Evre: 1B
E3	60	22	46	chtb(5)(q31) del(11)(p15) del(11)(q23) fra(17)(q21)	Adenokarsinom Grade: 2 Evre: 1B

Çizelge 11-devamı

HASTA KODU	YAŞI	METAFAZ SAYISI	MODAL SAYI	KROMOZOMAL ANOMALİ	HİSTOPATOLOJİK TANI
E4	69	57	46	gap(1)(q32)[2] gap(1)(p36) gap(3)(p21) fra(5)(q35) fra(5)(q31) gap(5)(q31)[4] fra(7)(q22) fra(14)(q32)	Adenokarsinoma Grade 1 Evre: 1B
E5	68	41	25-46	1ph+ gap(1)(p32) chtb(1)(p12) gap(1)(q32) gap(1)(p22) 3qh+ gap(3)(p14)[4] gap(3)(q21)[2] del(3)(q21→ter)(p21→ter) del(5)(p15) gap(5)(q22) gap(5)(q31) fra(5)(q31)[2] fra(6)(q25) heteroploidi(7)(q21) inv(9)(q12-34) fra(11)(q23)	Adenokarsinoma Grade 3

Çizelge 11-devamı

HASTA KODU	YAŞI	METAFAZ SAYISI	MODAL SAYI	KROMOZOMAL ANOMALİ		HISTOPATOLOJİK TANI
E6	64	85	19-141	del(1)(p21) del(1)(p21-22) del(1)(q31)[2] del(1)(p36)[2] del(1)(p22,q32) del(1)(p13,q22) fra(1)(p36) fra(1)(q42) fra(1)(p22) chtb(1)(p32)[2] chtb(1)(q21) chtb(1)(q23) chtb(2)(q31) chtb(2)(q11)[2] chtb(2)(q35) chtb(2)(p13) chtb(2)(q21)[2] chtb(2)(q32) del(3)(p21,q21)[4] del(3)(p21,q25)[2] del(3)(q25)[2] del(3)(p13,q21) del(3)(p23,q21)[2] chtb(3)(p21)[2] del(4)(p15)[2] fra(4)(q21) chtb(4)(p11) chtb(4)(p14) chtb(4)(q21) chtb(4)(q12) del(5)(p15) fra(5)(q31)[3] chtb(5)(q13) chtb(5)(q31) dup(5)(q22) del(6)(q11)	Del(6)(q21) del(6)(q15) chtb(6)(q23) chtb(7)(q11) der(7,17)(p , p) del(9)(q13) chtb(9)(q22)[3] fra(10)(p13)[2] chtb(10)(p11) del(12)(p13)[4] fra(12)(q13) chtb(12)(p12) chtb(12)(q13)[2] gap(12)(q22) fra(13)(q22) gap(13)(q14)[3] gap(13)(q22)[3] fra(14)(q22) gap(15)(q15)[3] del(16)(q23) fra(16)(p13) chtb(16)(p13) chtb(17)(p13)[2] chtb(17)(q21) chtb(17)(q11) chtb(20)(p11) del(X)(q26)[2] fra(X)(q27) fra(X)(p22) chtb(X)(q26) izo(Xq) dmin[13] end[2] erken sentromer ayrılması ace radial görünüm[7]	Malign Mülleryan Mixt. Tümörü Grade 2

Çizelge 11-devamı

HASTA KODU	YAŞI	METAFAZ SAYISI	MODAL SAYI	KROMOZOMAL ANOMALİ	HİSTOPATOLOJİK TANI
79	38-92			gap(1)(q32) fra(1)(q21) fra(1)(q32)[4] gap(3)(p21)[3] fra(3)(p21) del(4)(p16) del(5)(p15)[3] fra(5)(q31-33) fra(5)(q31)[7] fra(9)(q32) fra(10)(q23) fra(12)(q13) 13p ⁺ fra(17)(q25) del(21)(q22)	Adenokarsinom Grade 2
E8	59	12	46	fra(3)(p14) fra(6)(q21) fra(12)(q24)[12] fra(X)(q26)	Adenosquamöz Karsinoma, Grade 2
E9	64	60	46	del(3)(p25) chth(3)(q12) fra(9)(q34) fra(11)(q24)	Endometriyoid Karsinom Grade 2, 1C
E10	61	18	46	fra(12)(q24)	Endometriyoid Karsinom Grade 2, 3C Rektal, mesane, omentum invaze
E11	69	11	46	fra(2)(q35)	Adenokarsinoma Grade 2, 1B
E12	62	42	46	-	Epitelyal Malign Tümör indiferansiye Adenokarsinom, Grade 2

Ovaryum (11) ve endometriyum (12) kanserli hastaların kültürlerinde kromozom başına (sırasıyla 1-22. ve X kromozomlarında) gözlenen frajil bölgeler Çizelge 12'de verilmiştir. Kanser sitogenetiğinde amaç rastgele kromozom anomalilerinin arasından

en az iki ayrı hücrede gözlenen klonal değişiklikleri belirlemektir. Çizelge 12 incelendiğinde klonal değişiklik olarak nitelendirilecek olan 2'den fazla hücrede gözlenen frajil bölgeler belirtilmiştir. Klonal olan frajil bölgeler parantez içinde kaç hücrede görüldüğü belirtilerek gösterilmektedir.

Ovaryum kanserli olgularda 2., 4., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 13., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 22. ve X kromozomunda frajilite, gap ve kromatid kırığı gibi anomalilere rastlandığı halde klonal değişiklik olarak belirtilebilecek bir anomaliye rastlanmamıştır. Klonal değişiklik olarak gözlenen anomaliler 1. kromozomda 1q21[4] ve 1q32[2] bölgelerinde, 3. kromozomda 3p25[3] ve 3q11[2] bölgelerinde; 5. kromozomda 5p13[3] ve 5q31[3] bölgelerinde, 12. kromozomda 12p10[3] ve 12q12[4] bölgelerinde ve 14. kromozomda 14q13[2] bölgesinde gözlenmiştir.

Endometriyum kanserli olgularda ise klonal değişiklik oranı ovaryum kanserli olgulara göre daha fazladır. Hiç anomali gözlenmeyen kromozomlar 8. ve 18. kromozomlar iken, 14., 15., 19., 20. ve 22. kromozomlarda çeşitli frajilitelere rastlandığı halde hiç klonal değişiklik gözlenmemiştir. Klonal değişiklik olarak gözlenen anomaliler 1. kromozomda 1p21[2], 1p22[3], 1p32[3], 1p36[4], 1q21[2], 1q31[2] ve 1q32[10] bölgelerinde; 2. kromozomda 2p13[3], 2q11[2], 2q21[2] ve 2q35[2] bölgelerinde, 3. kromozomda 3p14[5], 3p21[15], 3p23[2], 3q21[10] ve 3q25[4] bölgelerinde; 4. kromozomda 4p15[2] ve 4q21[2] bölgelerinde; 5. kromozomda 5p15[5], 5q22[2] ve 5q31[25] bölgelerinde; 6. kromozomda 6q21[2] bölgesinde; 7. kromozomda 7q21[2] ve 7q22[2] bölgelerinde; 9. kromozomda 9q22[3] ve 9q34[3] bölgelerinde; 10. kromozomda 10p13[2] bölgesinde; 11. kromozomda 11p15[3], 11q23[4] ve 11q24[2] bölgelerinde; 12. kromozomda 12p12[2], 12p13[4], 12q13[4] ve 12q24[3] bölgelerinde; 13. kromozomda 13q14[3] ve 13q22[4] bölgelerinde; 16. kromozomda 16p13[2] bölgesinde; 17. kromozomda 17p13[2] ve 17q21[10] bölgelerinde; 21. kromozomda 21p13[2] bölgesinde ve X kromozomunda Xq26[3] ve Xq27[2] bölgelerinde gözlenmiştir.

Literatürlerde kanser kırılma noktaları ve frajil bölgeleri olarak değerlendirilmiş olan 1p36, 1q21, 7q22, 11p15, 11q13, 11q23, 12q13, 16p13'teki frajiliteler incelediğimiz endometriyum kanserlerinde, 1q21, 7q22 ve 11q23'teki frajiliteler ise ovaryum kanserlerinde gözlenmiştir.

Radyal görünüm ve endoreduplikasyona sadece E6 olgusunda rastlanmıştır. dmin yapılar, O11 ve E6 olgularında gözlenmiştir (Çizelge 11).

Çizelge 12. Ovaryum (11) ve endometriyum (12) kanserli dokularda kromozom başına gözlenen kırılma noktaları, fra, chtb, gap, del ve klonal değişimler. Son yayınlara^{110,111} göre kanser kırılma noktası olarak değerlendirilmiş bölgeler koyu renkte gösterilmiştir.

KROMOZOM NO	OVARYUM KANSERİ	ENDOMETRİYUM KANSERİ
1	1p34 1q21[4] 1q32[2]	1p12 1p13 1p21[2] 1p22[3] 1p32[3] 1p36[4] 1q11 1q21[2] 1q22 1q23 1q31[2] 1q32[10] 1q42
2	2q23 2q31 2q33	2p11-12 2p13[3] 2q11[2] 2q21[2] 2q31 2q32 2q35[2]
3	3p13 3p14 3p21 3p25[3] 3q11[2] 3q12 3q21 3q27 3q28	3p13 3p14[5] 3p21[15] 3p23[2] 3p25 3q12 3q21[10] 3q25[4]
4	4p16 4q11 4q12	4p11 4p14 4p15[2] 4p16 4q12 4q21[2]
5	5p13[3] 5p14 5p15 5q12 5q31[3]	5p15[5] 5q13 5q22[2] 5q31[25] 5q33 5q35
6		6q11 6q15 6q21[2] 6q23 6q25

Çizelge 12-devamı

7	7q22	7q11 7q21[2] 7q22[2] 7q34
8	8q21	
9	9p22	9q12 9q13 9q22[3] 9q32 9q34[3]
10	10q22	10p11 10p13[2] 10q23
11	11q23 11q25	11p15[3] 11q23[4] 11q24[2]
12	12p10[3] 12q12[4]	12p12[2] 12p13[4] 12q13[4] 12q22 12q24[3]
13	13p11	13q14[3] 13q22[4]
14	14q13[2] 14q24	14q11 14q22 14q24 14q32
15	15p11	15q15 15q22
16		16p13[2] 16q23
17	17q24	17p13[2] 17q11 17q21[10] 17q25
18	18q11 18q23	
19		19q13
20		20p11
21		21p13[2] 21q11 21q22
22		22p13 22q13
X		Xp22 Xq26[3] Xq27[2]

Çizelge 13 ve 14'te ovaryum ve endometriyum kanseri olgularında kromozom başına görülen anomalilerin frekansı en yüksekte en düşüğe doğru sıralanmıştır. Her iki grupta da en yüksek anomalinin kromozom 3'te olduğu ve onu kromozom 5 ve 1'in takip ettiği görülmektedir.

Çizelge 13. Ovaryum kanseri gurubunda kromozom başına görülen anomalilerin frekansı (en yüksekte en düşüğe doğru sıralanmıştır)

Kromozom Numarası	Anomali sayısı/Analiz edilen metafaz sayısı	Ovaryum kanseri olgularında anomali %'si
3	12/315	3.8
5	9/315	2.85
1 ve 12	7/315	2.22
2, 4 ve 14	3/315	0.95
11 ve 18	2/315	0.63
7,8,9,10,13,15 ve 17	1/315	0.31

Çizelge 14. Endometriyum kanseri gurubunda kromozom başına görülen anomalilerin frekansı (en yüksekte en düşüğe doğru sıralanmıştır)

Kromozom Numarası	Anomali sayısı/Analiz edilen metafaz sayısı	Endometriyum kanseri olgularında anomali %'si
3	40/488	8.2
5	35/488	7.17
1	32/488	6.55
12 ve 17	14/488	2.86
2	12/488	2.45
9 ve 11	9/488	1.84
4	8/488	1.63
13	7/488	1.43
6, 7 ve X	6/488	1.22
10, 14 ve 21	4/488	0.81
16	3/488	0.61
15, 18 ve 22	2/488	0.4
19 ve 20	1/488	0.2

Ovaryum ve endometriyum kanserli olgularda gözlenen anomalilerin olgulara göre %'si ve tümör grade'ine göre sıralanması Çizelge 15 ve 16'da verilmiştir. Grade yükseldikçe malignitenin arttığı bilindiğinden en malign ovaryum olgularında 1 ve 3 nolu kromozomlarda; endometriyum olgularında ise 1,3,5,9 nolu kromozomlarda en

fazla anomali olacağı görülmektedir (Çizelge 15 ve 16). Ayrıca endometriyum olgularında malignite ile anomalili kromozom sayısı belirgin şekilde artmaktadır (Çizelge 16). Ovaryum ve endometriyum kanserli olgularda gözlenen dmin yapılar, radyal görünüm ve endoreduplikasyonun görülme oranları Çizelge 17’de verilmiştir. Radial görünüm ve endoreduplikasyon ovaryum kanserlerinde görülmezken endometriyum kanserlerinde görülmekte (%1.43 ve %0.4), dmin yapılar ise ovaryum kanserlerinde %1.58, endometriyum kanserlerinde %2.66 oranında görülmektedir.

Çizelge 15. Ovaryum kanserli olgularda gözlenen anomalilerin olgulara göre %’si ve tümör grade’ine göre sıralanması

GRADE	OLGU KODU	ANOMALİ SAYISI/ANALİZ EDİLEN METAFAZ SAYISI; % DEĞERİ	ANOMALİ GÖZLENEN KROMOZOM NO
GRADE 3	O4	2/10; 20	1,22
GRADE 2	O1	16/60; 26.6	1,2,3,5,7,10,11,12,14,18
	O2	4/20; 20	1,4,5,17
	O5	7/35; 20	3,7,9,10,12,14,15,20
	O8	1/19; 5.2	1
	O10	13/32; 40.6	2
GRADE 1	O7	9/24; 37.5	2,3,9
	O9	0/11; 0	-
	O11	25/27; 92.6	2,3,4,5,9,11,12,13,15,18
GRADE’İ BELLİ OLMAYANLAR	O3	2/35; 5.7	1,8
	O6	2/42; 4.7	5

Çizelge 16. Endometriyum kanserli olgularda gözlenen anomalilerin olgulara göre %’si ve tümör grade’ine göre sıralanması

GRADE	OLGU KODU	ANOMALİ SAYISI/ANALİZ EDİLEN METAFAZ SAYISI; % DEĞERİ	ANOMALİ GÖZLENEN KROMOZOM NO
GRADE 3	E1	19/35; 54.3	1,2,3,5,7,9,11,12,14,15,17,19,21,22
	E5	21/41; 51.2	1,3,5,6,7,9,11
	E7	28/79; 35.44	1,3,4,5,9,10,12,13,17,21
GRADE 2	E6	121/85; 142.3	1,2,3,4,5,6,7,9,10,12,13,14,15,16,17,20,X
	E2	18/26; 69.23	2,5,7,11,14,17,21,X
	E3	4/22; 18	5,11,17
	E8	5/12; 41.6	3,6,12,X
	E9	4/60; 6.6	3,9,11
	E10	1/18; 5.5	12
	E11	1/11; 9	2
	E12	0/42; 0	-
GRADE 1	E4	12/57; 21	1,3,5,7,14

Çizelge 17. dmin yapılar, radial görünüm ve endoreduplikasyonun ovaryum ve endometriyum kanserlerinde görülme oranı (Anomali saptanan alan sayısı/Analiz edilen toplam alan sayısı: % oran)

	OVARYUM KANSERİ	ENDOMETRİYUM KANSERİ
Double minute (dmin)	5/315: %1.58	13/488: %2.66
Radial görünüm	-	7/488: %1.43
Endoreduplikasyon	-	2/488: %0.4

5. TARTIŞMA

Malignant transformasyona onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin inaktivasyonunun neden olduğu bilinmektedir. Normal hücre büyüme ve farklılaşmasını düzenleyen tümör süpresör genler, tümör hücrelerinde sıklıkla mutasyonlara uğrayarak hasar görürler.

Çalışmamızda, ovaryum ve endometriyum kanserli hastalardaki p53 mutasyonlarını belirlemek amacıyla BspLU11I, MaeIII, ItaI, MspI ve HinFI enzimleriyle Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP) analizi yapılmıştır.

Toplam 23 (11 ovaryum ve 12 endometriyum) kanser olgusunun ItaI enzimiyle kesimi sonucunda O1, O2, O6, O7 ve O9 olgularında triplet 244'te ve BspLU11I enzimiyle kesim sonucunda O11 olgusunda triplet 236'da mutasyon olduğu görülmüştür. Bu olgularda allellerden sadece birisinde mutasyon gözlenmesi heterozigot olduğunu düşündürmektedir. Triplet 238, 248 ve 259'da herhangi bir mutasyon saptanmamıştır.

Yapılan çalışmalarda ovaryum ve endometriyum kanserlerindeki nokta mutasyonlarının kodonlara göre sıklığı triplet 248'de %19, triplet 259 ile 244'te %8.1 ve triplet 236 ile 238'de %5.4 olarak verilmiştir^{14,15,16,17,18}. Tashiro ve ark. nın yaptığı bir çalışmada⁴⁷ ise endometriyal kanserlerdeki p53 geni mutasyon sıklığının %9.5-23 gibi geniş bir aralığa sahip olduğu gösterilmiş, bunun tümörün evre, grade ve tipine bağlı olabileceği bildirilmiştir^{46,47}.

Çalışmamızda p53 7. ekzon mutasyonları sadece ovaryum kanserli olgularda gözlenmiş, 11 olguda triplet 236 mutasyonu %9, triplet 244 mutasyonu % 45 olarak belirlenmiştir. Nitekim yapılan çalışmalarda da kodon 244 mutasyonu kodon 236 ve 238 mutasyonlarından daha yüksek oranda gözlenmiştir^{14,15,16,17,17}. Endometriyum kanserli olgularda ise herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir. Bu durum p53 7. ekzon mutasyonlarının (özellikle triplet 236 ve 244) ovaryum kanserlerinde daha yaygın olduğunu düşündürmektedir. Ovaryum tümörigenezinde endometriyum tümörigenezine göre p53 geni nokta mutasyonlarının daha önemli bir yer tuttuğu olası gibi görünmektedir. Tümör grade'ine göre sıralanmış ovaryum kanserli olguları incelediğimizde grade 2'deki O1, O2 olguları triplet 244'teki mutasyon açısından, grade 1'deki O7, O9 olguları triplet 244'teki mutasyon açısından, yine grade 1'deki O11

olgusu triplet 236'daki mutasyon açısından ve grade'i belli olmayan O6 olgusu da triplet 244'teki mutasyon açısından heterozigot görünmektedir. Çalışmamızda p53 mutasyonlarının sadece ovaryum kanserlerinde görülmesi bu kanser çeşidinin endometriyum kanserlerine göre daha agresif olması ile ilişkilendirilebilir^{19,88}. Zaten birçok çalışmada ovaryum kanserlerinin endometriyum kanserlerine göre daha agresif olduğu ve ovaryum kanserlerinin görülme oranının daha yüksek olduğu belirtilmiştir^{19,30,76}. Çalışmamızda endometriyum kanserlerinde p53 geni ekzon 7 mutasyonlarının görülmeysi bu kanserin gelişiminde belki de p53'ün diğer bölgelerindeki veya başka genlerdeki mutasyonların rol almış olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim birçok endometriyum kanseri çalışmasında 1, 3, 6, 8p, 9p, 10q, 11, 13, 14q, 15, 16q, 17p, 18p, 20, 21 ve 22q'da LOH saptanmış ve bu bölgelerin birçok aday tümör süpresör genini içerebileceği ileri sürülmüştür^{101,102,103,104}. Her grade'teki ovaryum tümöründe mutasyona rastlanabilmesi p53 mutasyonlarının ovaryum tümörigenezinde endometriyal tümörigeneze oranla daha erken evrelerde ortaya çıktığını işaret etmektedir^{28,29}. Nitekim Kohler ve ark.³⁰ endometriyal kanserlerde sadece %20 oranında p53 overekspresyonu ve mutasyonu bulmuşlar ve bu oranın evre ilerledikçe arttığını saptamışlardır. Mutasyonel analizler, uterin seröz kanserlerin (Tip II endometriyal kanser) öncüsü olan endometriyal intraepitelyal kanserlerin büyük çoğunluğunda (%78) p53'ün 5-8. ekzonlarında mutasyon varlığını göstermiştir⁴⁶. Dolayısıyla p53 mutasyonlarının bu tümör tipinin patogenezinde erken evrede gerçekleştiği ve agresif bir yapıya sahip uterin seröz kanserlerin önemli bir belirleyicisi olabileceği ileri sürülmüştür⁴⁶. Buna ek olarak uterin seröz kanserler oldukça nadirdir ve sporadik endometriyal kanserlerin yaklaşık %5-10'unu oluşturmaktadır^{45,46,141}. Sonuçta çalışmamızda 5 tripletteki mutasyonları incelenen endometriyum kanserlerinin yüksek oranda (%78) p53 mutasyonları görülen Tip II kanserler olmaması da muhtemeldir.

Çalışmamızda ovaryum kanserlerinde p53 nokta mutasyonları yanında kromozom düzeyinde de birçok anomali görülmüştür. Bu anomalilerden en önemlileri 1q22[4], 1q32[2], 3p25[3], 3q11[2], 5p13[3], 5q31[3], 12p10[3], 12q12[4] ve 14q13[2] bölgelerinde görülen frajilitelerdir. Bu frajiliteler en az iki hücrede gözlenmiş ve klonal değişim oldukları belirlenmiştir. Frajiliteler, kanser olgularında en çok rastlanan anomaliler olup özellikle klonal olanlarının önemi büyüktür. Çünkü klonal değişimler tümörigenez sürecinde ortaya çıkan primer değişimlerdir ve o kanser tipi için tanısıl öneme sahip marker olarak kullanılabilirler. Aynı ya da yakın kromozom anomalileri taşıyan hücrelerin bir klon oluşturdukları kabul edilir. Kanser sitogenetiğinde amaç,

rastgele kromozom anomalilerinin arasından klonal olanları ayırd etmektir. Klonların çoğunda ortak olarak bulunan bir kromozom anomalisi varsa, bunun primer bir kromozom değişikliği olma olasılığı fazladır. Bu spesifik kromozom anomalileri kimi durumlarda hastalığa tanı koymayı kolaylaştırabilir, tümör tiplerinin ayırd edilmesinde bir temel sağlayabilir, hastalığın prognozu hakkında fikir verebilir ve tedavinin yönlendirilmesinde yardımcı olabilirler.

Endometriyum kanseri olgularımızda da klonal değişim olarak nitelendirilebilecek frajiliteler 1p21[2], 1p22[3], 1p32[3], 1p36[4], 1q21[2], 1q31[2], 1q32[10], 2p13[3], 2q11[2], 2q21[2], 2q35[2], 3p14[5], 3p21[9], 3p23[2], 3q21[17], 3q25[4], 4p15[2], 4q21[2], 5p15[5], 5q22[2], 5q31[25], 6q21[2], 7q21[2], 7q22[2], 9q22[3], 9q34[3], 10p13[2], 10p15[3], 11q23[4], 11q24[2], 12p12[2], 12p13[4], 12q13[4], 12q24[4], 13q14[3], 13q22[4], 16p13[2], 17p12[2], 17q21[10], 21p13[2], Xq26[3] ve Xq27[2] bölgelerinde gözlenmiştir.

Son yayınlarda^{110,111} 1p36, 1q21, 1q32, 2p12, 3p21, 7q22, 8q24, 9q34, 11p15, 11q13, 11q23, 12q13, 14q11, 14q32, 16p11, 16p13, 19p13, 20q13, 21q22 ve 22q11 bölgelerindeki bantlar kanser kırılma noktaları; 1p36, 1q21, 7q22, 8q24, 11p15, 11q13, 11q23, 12q13, 16p13 ve 19p13 olmak üzere 10 bant kanser kırılma noktaları ve frajil bölgeler olarak değerlendirilmiştir¹¹¹. Bu kırılma noktalarından 1q21[4], 1q32[2], 3p21, 7q22 ve 11q23 bölgeleri ovaryum kanseri, 1p36[4], 1q32[10], 2p12, 3p21[9], 7q22[2], 9q34[3], 11p15[3], 11q23[4], 12q13[4], 14q11, 14q32, 16p13[2] ve 21q22 bölgeleri de endometriyum kanseri olgularımızda gözlenmiştir. Bu bölgelerin çoğunun saptadığımız klonal değişim bölgeleri ile çakışması klonal bölgelerin tümörigenezde ne kadar önemli olduğunu bir kez daha ortaya koymaktadır.

Her iki araştırma gurubumuzun sonuçlarından görüleceği gibi ovaryum ve endometriyum kanseri sitogenetiğinde 3. kromozomdaki anomaliler birinci sırada yer almaktadır. Üç no'lu kromozomun hem ovaryum hem de endometriyum kanseri açısından dikkate değer olduğu ve bu kanserlerin gelişiminde rol oynayan genleri taşıdığı düşünülebilir. Ayrıca ovaryum kanserli gurubumuzda 3. kromozomda delesyon saptanmamış fakat 3p25[3] ve 3q11[2]'de klonal değişim ve 3p13, 3p14, 3p21, 3q12, 3q21, 3q27, 3q28 bölgelerinde çeşitli frajiliteler ve kromatid kırıkları görülmüştür. Endometriyum kanserli gurubumuzda ise 3. kromozomda %16.6 oranında (12 hastanın 2'sinde) delesyonlar [del(3)(p21→ter,q21→ter), del(3)(p21→ter,q25→ter), del(3)(q25), del(3)(p13), del(3)(q21) ve del(3)(p23)] saptanmıştır. Nitekim bir çalışmada¹²⁶ uterin sarkomlarda, bulgularımızı destekler biçimde 3q26→ter delesyonu rapor edilmiştir.

Delesyonlar kanser oluşumunda genellikle tümör süpresör genlerin kaybına neden olarak etkili olurlar. Bazı delesyonlar özellikle belirli tümör tiplerinde sık görülmektedir^{113,116,123,124,125}.

Endometriyum kanseri gurubumuzda 3. kromozomda frajilitelere 3p14, 3p21, 3p23, 3q21 ve 3q25 bölgelerinde rastlanmıştır. Zhou et al¹⁴² tarafından bu bölgelerden 3p14 bölgesinde yüksek düzeyde kırılma olduğu bildirilmiştir. İnsan genomunda c-fra bölgelerin en aktif olanıdır ve moleküler temeli tam olarak bilinmemektedir. Ancak, bu bölgede frajilitenin meydana gelmesinde allel-spesifik geç replikasyonun işe karıştığı düşünülmektedir. 3p14'te ortaya çıkan frajilite bazı tümörlerin oluşumunda rol almaktadır. Bu bölgede bulunan FHIT (Frajil Histidin Triad) geninin akciğer, kolorektal ve diğer kanserler için aday bir tümör süpresör gen olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca son zamanlarda tanımlanmış DIRC2 (disrupted in renal cancer 2) geninin de 3q21 bölgesinde lokalize olduğu ve bu bölgelerdeki frajiliteler ile sporadik ve ailesel renal hücre karsinomları (RCC) arasında bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir¹⁴³. 3p14, 3p21 ve 3q21 bölgeleri endometriyum gurubunda oldukça yüksek oranda olmak üzere her iki kanser gurubumuzda da eksprese olmuştur. Bu bölgeler için diğer kanser türlerinde tanımlanmış tümör süpresör genler veya henüz tanımlanmamış daha başka genlerin bu iki kanser türünde özellikle de endometriyum kanserinde etkili olması muhtemeldir. Ayrıca çeşitli aday tümör süpresör genler ve hMLH1 geninin (HNPCC'a neden olan 4 DNA mismatch tamir genlerinden biri) bulunması nedeniyle 3p'de çeşitli yayınlarda^{100,101,102,103,104} belirlenen LOH ve çalışmamızda saptadığımız frajiliteler oldukça dikkat çekicidir.

5q31 bölgesindeki frajilite hem ovaryum kanseri hem de endometriyum kanseri olgularımızda en sık gözlenen frajilitedir. Nitekim 5q'daki delesyonlar birçok hematolojik malignanside gözlenmiştir¹⁴⁴. Hematolojik transformasyonlarda önemli bir tümör süpresör geninin bu bölgede lokalize olduğu düşünülmektedir. 5q31 bölgesine haritalanan aday genlerden biri de E7F1/eRF1 (human translation termination factor gene) miyeloyid tümör süpresör genidir^{144,145}. Ayrıca bu bölgede lokalize olduğu düşünülen 18 genle beraber 5 interlökin (IL) geninin de bulunduğu rapor edilmiştir¹⁴⁶. Her iki araştırma gurubunda da en sık oranda gözlenen bu bölgeye lokalize genlerin endometriyal ve ovaryum kanserlerinin gelişiminde de rol oynadığı düşünülebilir. Ayrıca ovaryum ve endometriyum kanserlerinde 5q31'de frajil bölge gözlenmesi önemli bir göstergedir. Çünkü, bu bölgede hücre adezyonundan sorumlu bir protein

üreten APC ve fonksiyonu henüz bilinmeyen, MCC tümör süpresör genleri bulunmaktadır¹⁴⁶.

Ovaryum kanseri gurubumuzda 1. kromozomda saptadığımız anomaliler (% 2.22), 1p34 (%0.3), 1q21 (%1.26) ve 1q32 (%0.63) bölgelerindedir. Thompson ve ark.¹²⁵, 1p üzerinde yer alan bir veya daha fazla tümör süpresör genin ovaryum kanserlerinde rol oynadığını rapor etmişlerdir. Bu araştırma ovaryum gurubundaki 1p34 bulgumuzu desteklemektedir.

Endometriyal tümörigenezde rol oynayan tümör süpresör genlerin bulunduğu genom bölgelerinin lokalizasyonu ile ilgili çalışmalar yapan Fujino ve ark¹⁰³, 1. kromozomun çeşitli lokuslarında LOH saptamıştır. Laxman ve ark¹²⁷,nın 14 uterin sarkom örneği ile yaptıkları bir çalışmada; 1. kromozomda %54 oranında anomali belirlemişlerdir. Endometriyal kanser gurubunda saptadığımız 1p12, 1p13, 1p21[2], 1p22[3], 1p32[3], 1p36[4], 1q11, 1q21[2], 1q22, 1q23, 1q31[2], 1q32[10] ve 1q42 bölgelerindeki frajilitelerin literatürle uyumlu olduğu ve 1p21, 1p22, 1p32, 1p36, 1q21, 1q31, 1q32'deki değişimlerin klonal değişim oldukları belirlenmiştir. Zaten 1p36 bölgesinde haritalanan 6 genin aday tümör süpresör genler olduğu öne sürülmüştür¹²⁵: Bu genler; gelişimin negatif düzenleyicileri ailesinin nöroektodermal eksprese edilen bir üyesi olan Heir-1(ID3); 2 tümör nekroz faktör reseptör geninden biri olan TNFR2; hücre döngüsü düzenleyicisi kinaz geni PITSLRE; bir transkripsiyon faktörü olan DAN; Traskripsiyon faktörü düzenleyicisi E2F2 ve PAX7 (paired-box-containing gene) dir. Bu aday genlerden bir veya bir kaçındaki hasarın endometriyum kanseri gelişimine yol açtığı düşünülmektedir¹²⁵.

Her iki kanser gurubumuzda 7. kromozomda 7q22 bölgesinde frajilite görülmüştür. Literatürlere göre bu noktalar önemli kanser kırılma noktalarıdır^{110,111}. 7q22'de ortaya çıkan frajilite uterin leiomyoma¹⁴⁷, endometriyal polipler¹⁴⁸, akciğer kanseri¹⁴⁹, gastrik ve özofagus adenokarsinomları¹⁵⁰ ve hematolojik malignansilerin¹⁵¹ oluşumunda rol oynamaktadır. CUTL1 (human cut-like 1) geni, mismatch tamir geni PMS2L, erythropoietin geni EPO ve asparajin sentaz geni ASNS, 7q22 bölgesine haritalanmış genler arasındadır. ASNS geni bir hücre döngüsü kontrol enzimini kodlamaktadır ve AML (acute myelocytic leukemia) olgularında bu enzimin düşük seviyelerde olduğu rapor edilmiştir¹⁵¹. Sonuçlarımıza bakarak bu bölgeye lokalize genlerin ovaryum ve endometriyum kanserlerinin gelişiminde de rol oynadığı düşünülebilir.

Endometriyal kanserlerde 17p'de %9-35 oranında LOH rapor edilmiştir. Uterin seröz kanserlerle yapılan bir çalışmada informatif olguların %100'ünde 17p'de, özellikle 17p13 bölgesinde LOH saptanmıştır^{102,103,104}. Bu bulgu, 17p13 bölgesi p53 geninin lokalize olduğu bölge olduğu için dikkat çekicidir. Endometriyum kanserlerinde 17p13[2] bölgesinde klonal değişim bulgumuz bu açıdan önemlidir. 17q21[10] bölgesi endometriyum kanseri grubumuzda gözlediğimiz üçüncü en sık frajilitedir. Bu bölgede de endometriyal karsinogenez açısından önemli fakat henüz tanımlanmamış genler bulunması olasıdır.

Çalışmamızda, ovaryum ve endometriyum kanserlerinde tümör grade'i ile görülen yapısal anomali oranındaki artış literatürlerle^{55,112} uyumludur. Fakat bu artış, endometriyum kanserlerinde daha fazla olmuş ve malignite arttıkça anomali gözlenen kromozom sayısında bariz bir artış olmuştur. Heriki kanser grubumuzda saptanan ve küçük çift halde bulunan ekstrakromozomal kromatin parçacıkları olan dmin yapılar, sitogenetik olarak gözlenebilen amplifikasyon seviyesinin dolayısıyla sayıları yüzlerce kez artan genlerin göstergesidir.

Tümörigenezde sayısal kromozom anomalilerine de rastlanabilir. Wang ve ark¹²⁴, iki ovaryum kanseri olgusunda 10. kromozomun trizomisine rastlamışlardır. Kohlberger ve ark¹²⁶, 30 malin epitelyal ovaryum kanserinin sitogenetik incelemesinde 14 (%82.3) trizomi 7, 11 (%64.7) trizomi 12 ve 5 (%29.4) trizomi 17 saptamışlardır. Ovaryum kanseri grubumuzdan O4, O5, O6, O7, O8, O9 ve O11 ve endometriyum kanseri olgularımızdan E1, E5, E6 ve E7 olgularında sayısal sapmalar gözlenmiştir. Bu sapmalar farklı metafaz alanlarında farklı olmuştur ve O5 olgusu dışında belli bir kromozomun sayısal anomalisi gözlenmemiştir. Sayısal sapmalar endometriyum kanseri grubuna göre ovaryum kanseri grubunda daha fazla görülmüştür. O5 olgumuzda ise 9, 10, 14, 15 ve 20. kromozomların trizomisi ve 12. kromozomun pentazomisi gözlenmiştir. Trizomi 10 ve 12 ovaryum kanserlerinde görülen primer kromozomal değişiklikler olarak kabul edilirler¹²⁴. Sayısal artışlar etkilerini olasılıkla belli gen ürünlerinin artışıyla göstermektedir. Çalışmamızdaki 11 ovaryum olgusundan birinde (%9) bu değişiklikleri saptamamız bu açıdan önemli bir bulgudur. Literatürlerle^{124,126} uyumlu olarak sayısal kromozom anomalilerinin ovaryum kanserlerinde görülme oranının endometriyum kanserlerinde görülme oranına göre daha fazla olduğunu söylemek mümkündür.

Kimi zaman tümör materyalinden elde edilen bütün hücrelerde normal (46,XX ya da 46,XY) kromozom yapısı gözlenir. Standart bant teknikleriyle 2×10^6 nükleotid

çifti ya da daha küçük delesyonları saptamak güçtür. Aşağı yukarı 1000 gen bant yöntemleriyle farkedilmeksizin duplike olabilir ya da delesyona uğrayabilir. Yani, kromozom bantlama teknikleriyle saptanabilen değişiklikler, kanser hücresindeki genetik değişikliklerin sadece bir bölümüdür. Bu nedenle kimi tümörlerde olduğu gibi sadece normal metafazlar görülmesi, kanserin somatik mutasyon teorisine ters düşmez. Ayrıca tümör örneklerinde gözlenen normal karyotipli hücrelerin gerçekten tümör hücresi olup olmadığı da bilinemez. Bunların tümörde bulunan stromal komponentlerden birine ait normal hücreler olma olasılığı da göz ardı edilmemelidir^{116,118}. O9 olgumuzda da bu duruma benzer şekilde herhangi bir anomali gözlenmemiştir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ç.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalınca ameliyat edilmiş hastaların ovaryum ve endometriyum kanserli dokuları ile gerçekleştirdiğimiz moleküler ve sitogenetik çalışmalarımızda, bu iki kanser tipi ile ilgili aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir.

- Çalışmamızda, ovaryum kanserlerinin gelişiminde p53 geninin 7. ekzonundaki triplet 236 ve 244 nokta mutasyonlarının önemli bir yeri olduğu belirlenmiştir.
- Endometriyum kanserlerinde p53 geninin 7. ekzonunun 5 tripletinde hiç mutasyon saptanmamıştır. Endometriyum kanserlerinde p53 geni mutasyonlarının, 7. ekzonun başka tripletlerinde veya diğer ekzonlarında (5-8) olabileceği düşünülebilir.
- Tümörigenez sürecinde ortaya çıkan primer değişimler olan ve o kanser tipi için tanınan öneme sahip marker olarak kullanılabilen klonal kromozom bölgeleri ovaryum kanserleri için 1q22, 1q32, 3p25, 3q11, 5p13, 5q31, 12p10, 12q12 ve 14q13 olarak belirlenmiştir. Bu bölgelerin ovaryum kanserinin tümörigenezinde yer alan önemli genlerin araştırılmasında dikkate alınması gerekmektedir.
- Endometriyum kanserleri için; 1p21, 1p22, 1p32, 1p36, 1q21, 1q31, 1q32, 2p13, 2q11, 1q21, 2q35, 3p14, 3p21, 3p23, 3q21, 3q25, 4p15, 4q21, 5p15, 5q22, 5q31, 6q21, 7q21, 7q22, 9q22, 9q34, 10p13, 10p15, 11q23, 11q24, 12p12, 12p13, 12q13, 12q24, 13q14, 13q22, 16p13, 17p13, 17q21, 21p13, Xq26 ve Xq27'deki klonal kromozom bölgeleri tümörigenezden sorumlu aday genlerin araştırılmasında yardımcı olacaktır.
- Çalışmamızda; literatürde belirtilenen kanser kırılma noktaları ve fragil bölgelerden 1q21, 1q32, 3p21, 7q22 ve 11q23 bölgeleri ovaryum kanseri ve 1p36, 1q32, 2p12, 3p21, 7q22, 9q34, 11p15, 11q23, 12q13, 14q11, 14q32, 16p13 ve 21q22 bölgeleri de endometriyum kanseri olgularımızda görülmüştür. Bu kanser tipleri ile ilişkili aday genler araştırılırken bu bölgelere özellikle önem verilmesi gerekmektedir.
- Ovaryum ve endometriyum kanserlerinde tümör grade'i arttıkça yapısal kromozom anomalisi oranı artmaktadır. Ancak bu artışın endometriyum kanserinde ovaryum kanseri gurubuna göre daha bariz şekilde olduğu ve giderek karyotipin kompleksleştiği ve anomali gözlenen kromozom sayısının arttığı gözlenmiştir.

- Dmin yapılar endometriyum kanserinde ovaryum kanserine göre daha yüksek oranda gözlenmiştir. Radial görünümler sadece endometriyum kanserinde gözlenmiştir. Bu nedenle frajilitelerin ve gen amplifikasyonlarının endometriyum kanserinin tümörigenezinde ovaryum kanserine oranla daha fazla etkili olduğu söylenebilir.
- Ovaryum kanserlerine özgü primer kromozomal değişiklik olarak kabul edilen trizomi 10 ve 12, çalışmamızda trizomi 10 ve pentazomi 12 olarak bir olgumuzda gözlenmiştir. Bu kromozomların ovaryum kanseri patogeneğinde önemli yer tuttıkları düşünülmüştür.

Çalışmamızın sonuçlarına dayanarak p53 geni ekzon 7'deki triplet 236 ve 244 mutasyonları ovaryum kanserlerinde ve çalışmamızda incelenmeyen başka bir triplette veya tripletlerdeki mutasyonlarının endometriyum kanserlerinde belirleyici özelliği olabileceği söylenebilir. Endometriyum kanserlerinde p53 geni mutasyonlarını belirlemek için 7. ekzonun başka tripletleri ve diğer ekzonlarının incelenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda ovaryum ve endometriyum kanserlerine özgü belirleyici sitogenetik özellik olabilecek ve çeşitli frajiliteler şeklinde ortaya çıkan çok sayıda kromozomal bölge saptanmıştır. Endometriyum kanserlerinde ovaryum kanserlerine göre çok daha fazla sitogenetik bulgu dolayısıyla daha karmaşık bir karyotip mevcuttur. Birçok genin bu kanser tipinin tümörigenezi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda ovaryum ve endometriyum kanserlerinde belirlenen klonal değişimler, bu kanserlerin gelişiminde rol oynayan major genlerin kromozom lokalizasyonlarının araştırılmasında yol gösterici olacaktır. Bu konuda daha fazla sitogenetik, moleküler sitogenetik (FISH, CGH) ve moleküler çalışmaların yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Lewin B. *Genes*. New York: Oxford University Press, 1997: 1089-1171.
2. Cooper GM. *The Cell, A Molecular Approach*. Washington: ASM Press, 1997: 521-633.
3. Ekmekçi A, Erbaş D. *Kanserin Moleküler Mekanizması*. Ankara, 1991: 44-103
4. Sultuybek G, Ulutin T, Sayhan N. *Rekombinant DNA Teknolojisi ve Tıpta Kullanımı*. İstanbul, 1995
5. Pasternak JJ. *An introduction to Human Molecular Genetics*, 1999: 365-413.
6. Weaver RF, Hedrick PhW. *Genetics*. 3rd Ed., 1997: 482-502
7. Passarge E. *Genetik atlası*, Çev.: Lüleci G, Sakızlı, M, Alper Ö. 2000: 260-273.
8. Mange EJ, Mange AP. *Basic Human Genetics*. 2nd Ed., 1999: 365-388
9. Bates S, Vousden KH. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1999; 55: 28-37.
10. Oren M, Rotter V. Introduction: p53 - the first twenty years. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1999; 55: 9-11.
11. Liang SB, Ohtsuki Y, Furihata M, Takeuchi T, Iwata J, Chen BK, Sonobe H. Sun-exposure- and aging-dependent p53 protein accumulation results in growth advantage for tumour cells in carcinogenesis of nonmelanocytic skin cancer. *Virchows Archiv*, 1999; 434: 193-199.
12. Ross DW. Cancer: The Emerging molecular biology. *Hospital Practice*. New York, 2000; 35(1): 63-73.
13. Vos M, Adams CH, Victor TC, van Helden PD. Polimorphisms and mutations found in the regions flanking exons 5 to 8 of the TP53 gene in a population at high risk for esophageal cancer in South Africa. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2003; 140: 23-30
14. Enomoto T, Fujita M, Inoue M. Alterations of the p53 tumor suppressor gene and its association with activation of the c-K-ras-2 protooncogene in premalignant and malignant lesions of the human uterine endometrium. *Cancer Research*, 1993; 53: 1883-1888.
15. Milner BJ, Allan LA, Eccles DM. p53 mutation is a common genetic event in ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 1993; 53: 2128-2132.

16. **Okamoto A, Sameshima Y, Yokoyama S.** Frequent allelic losses and mutations of the p53 gene in human ovarian cancer. *Cancer Research*, 1991; 51: 5171-5176.
17. **Okamoto A, Sameshima Y, Yameda Y.** Allelic loss on chromosome 17p and p53 mutations in human endometrial carcinoma of the uterus. *Cancer Research*, 1991; 51: 5632-5636.
18. **Mok CH, Tsao SW, Knapp RC, Fishbaugh PM, Lau CC.** Unifocal origin of advanced human epithelial ovarian cancers. *Cancer Research*, 1992; 52: 5119-5122.
19. **Dubeau L.** Ovarian Cancer. In: Vogelstein B, Kinzler KW. *The Genetic Basis of Human Cancer*. 2nd Ed., New York: Mc Graw Hill Medical Publishing Division, 2002: 675-680.
20. **Vardar MA.** Endometriyal Kanserde Erken Tanı ve Tarama. *Arşiv*. 2000; 9: 311-324.
21. **Cheng PC, Gosewehr JA, Kim TM, Velicescu M, Wan M, Zheng J, Felix JC, Cofer KF, Luo P, Biela BH, Godorov G, Dubeau L.** Potential role of the inactivated X chromosome in ovarian epithelial tumor development. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996; 88: 510.
22. **Ivabuchi H, Sakamoto M, Sakunaga H, Ma YY, Carcangiu ML, Pinkel D, Yang Feng TL, Gray JW.** Genetic analysis of benign, low-grade and high-grade ovarian tumors. *Cancer Research*. 1995; 55: 6172.
23. **Zheng JP, Robinson WR, Ehlen T, Yu MC, Dubeau L.** Distinction of low grade from high grade human ovarian carcinomas on the basis of losses of heterozygosity on chromosomes 3, 6 and HER-2/neu gene amplification. *Cancer Research*. 1991; 51: 4045.
24. **Dodson MK, Hartmann LC, Cliby WA, DeLacey KA, Keeney GL, Ritland SR, Su JQ, Podratz KC, Jenkins RB.** Comparison of loss of heterozygosity patterns in invasive low-grade and high-grade epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Research*. 1993; 53: 4456.
25. **Hansen, LL, Jensen LL, Dimitrakakis C, Michalas S, Gilbert F, Barber HRK, Overgaard J, Arzimanoglou.** Allelic imbalance in selected chromosomal regions in ovarian cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2002; 139: 1-8.
26. **Wan M, Li W-Z, Duggan B, Felix J, Zhao Y, Dubeau L.** Telomerase activity in benign and malignant epithelial ovarian tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997; 89: 437.
27. **Cheng PC, Schmutt C, Cofer KF, Felix JC, Yu MC, Dubeau L.** Alterations in DNA methylation are early, but not initial events in ovarian tumorigenesis. *British Journal of Cancer*. 1997; 75: 396.
28. **Zheng J, Benedict WF, Xu H-J, Hu S-X, Kim TM, Velicescu M, Wan M, Cofer KF, Dubeau L.** Genetic disparity between morphologically benign cysts contiguous to ovarian carcinomas and solitary cystadenomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995; 87: 1146.
29. **Wertheim I, Muto MG, Welch WR, Bell DA, Berkowitz RS, Mok SC.** P53 gene mutation in human borderline epithelial ovarian tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994; 86: 1549.

30. Kohler MF, Berchuck A, Davidoff AM, Humphrey PA, Dodge RK, Iglehart JD, Soper JT, Clarke-Pearson DL, Bast RC, Marks JR. Overexpression and Mutation of p53 in Endometrial Carcinoma. *Cancer Research*, 1992; 52: 1622-1627.
31. Berker B, Dunder I, Ensari A, Cengiz SD. Prognostic value of p53 accumulation in epithelial ovarian carcinomas. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2002; 266: 205-209.
32. <http://www.oncodx.com/cancers/ovarian> (erişim: 03.10.2003)
33. Sato T, Saito H, Morita R, Koi S, Lee JH, Nakamura Y. Allelotype of human ovarian cancer. *Cancer Research*, 1991; 51: 5118.
34. Cliby W, Ritland S, Hartmann L, Dodson M, Halling KC, Keeney G, Podratz KC, Jenkins RB. Human epithelial ovarian cancer allelotype. *Cancer Research*, 1993; 53: 2393.
35. Pejovic T. Genetic changes in ovarian cancer. *Annals of Medicine*, 1995; 27: 73.
36. Thompson FH, Emerson J, Alberts D, Liu Y, Guan XY, Burgess A, Fox S, Taetle R, Weinstein R, Makar R, Powell D, Trent J. Clonal chromosome abnormalities in 54 cases of ovarian carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1994; 73: 33.
37. Persons DL, Hartmann LC, Herath JF, Borell TJ, Cliby WA, Keeney GL, Jenkins RB. Interphase molecular cytogenetic analysis of epithelial ovarian carcinomas. *American Journal of Pathology*, 1993; 142: 733
38. Herod JJ, Eliopoulos AG, Warwick J, Niedobitek G, Young LS, Kerr DG. The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 1996; 56: 2178.
39. Rosen A, Sevela P, Klein M, Dobianer K, Hruza C, Czerwenka K, Hanak H, Vavra N, Salzer H, Leodolter S, Medl M, Spona J. First experience with FGF-3 (INT-2) amplification in women with epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 1993; 67: 1122.
40. Henriksen R, Wilander E, Oberg K. Expression and prognostic significance of Bcl-2 in ovarian tumors. *British Journal of Cancer*, 1995; 72: 1324.
41. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clarke Pearson DL, Marks P, McKenzie S, Yin S, Bast RC. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Research*, 1990; 50: 4087.
42. Yu D, Matin A, Xia W, Sorgi F, Huang L, Hung MC. Liposome-mediated in vivo E1A gene transfer suppressed dissemination of ovarian cancer cells that overexpress HER-2/neu. *Oncogene*, 1995; 11: 1383.
43. Hung MC, Matin A, Zhang Y, Xing X, Sorgi F, Huang L, Yu D. HER-2/neu-targeting gene therapy-a review. *Gene*, 1995; 159: 65.

44. Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, Pegram MD, Howell SB, Slamon DJ. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*, 1994; 9: 1829.
45. Mujoo K, Maneval DC, Anderson SC, Gutterman JU. Adenoviral-mediated p53 tumor suppressor gene therapy of human ovarian carcinoma. *Oncogene*, 1996; 12: 1617.
46. Ellenson LH. Endometrial Cancer. In: Vogelstein B, Kinzler KW. *The Genetic Basis of Human Cancer*. 2nd Ed., New York: Mc Graw Hill Medical Publishing Division, 2002: 681-688.
47. Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L. P53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *American Journal of Pathology*, 1997; 150: 177.
48. Inoue M, Okayama A, Fujita M, Enomoto T, Sakata M, Tanizawa O, Ueshima H. Clinicopathological characteristics of p53 overexpression in endometrial cancers. *International Journal of Cancer*, 1994; 58: 14.
49. Ito K, Watanabe K, Nasim S, Sasano H, Sato S, Yajima A, Silverberg SG, Garrett CT. Prognostic significance of p53 overexpression in endometrial cancer. *Cancer Research*, 1994; 54: 4667.
50. Fujisawa T, Watanabe J, Akaboshi M, Ohno E, Kuramoto H. Immunohistochemical study on VEGF expression in endometrial carcinoma- comparison with p53 expression, angiogenesis and tumor histologic grade. *Springer-Verlag*, 2001
51. Jiko K, Sasano H, Ito K, Ozawa N, Sato S, Yajima A. Immunohistochemical and in situ hybridization analysis of p53 in human endometrial carcinoma of the uterus. *Anticancer Research*, 1993; 13: 305.
52. Kihana T, Hamada K, Inoue Y, Yano N, Iketani H, Murao S-I, Ukita M, Matsuura S. Mutation and allelic loss of the p53 gene in endometrial carcinoma. *Cancer*, 1995; 76: 72.
53. Sherman ME, Bur ME, Kurman RJ. P53 in endometrial cancer and its putative precursors: Evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Human Pathology*, 1995; 26: 1268.
54. Sandberg AA, Carel CT, Gemmil, RM. *Cancer Research*, 1988; 48: 1049-1059.
55. Güven GS, Hacihanefioğlu S. Frajl Bölgeler ve Klinik Önemleri. *Klinik Gelişim*, 2000; 13: 336-343.
56. Plaja A, Miro R. Chromosome aneuploidy and cancer: lessons from a chromosomal instability syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2001; 131: 144-145.
57. Klug WS, Cummings MR. *Genetik Kavramlar*. 6. baskı çevirisi, Ankara: Çev. Ed: Öner C., Palme yayıncılık, 2002;

58. Wong KB, DeDecker BS, Freund SMF, Proctor MR, Bycroft M, Fersht AR. Hot-spot mutants of core domain evince characteristic local structural changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1999; 96: 8438-8442.
59. Chen PL, Chen Y, Bookstein R, Lee WH. Genetic Mechanisms of Tumor Suppression by the Human p53 Gene. *Science*, 1990; 250: 1576-1580.
60. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 Mutations in Human Cancers. *Science*, 1991; 253: 49-53.
61. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The Tumour suppressor gene. *Nature*, 1991; 351: 453-6.
62. Hainaut P, Soussi T, Shomer B, Hollstein M, Greenblatt M, Hovig E, Harris CC, Montesano R. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucleic Acids Research*, 1997; 25(1): 151-157.
63. Behn M, Qun S, Pankow W, Havemann K, Schuermann M. Frequent Detection of ras and p53 Mutations in Brush Cytology Samples from Lung Cancer Patients by a Restriction Fragment Length Polymorphism-based "Enriched PCR" Technique. *Clinical Cancer Research*, 1998; 4: 361-371.
64. Çakmakçoğlu ŞÇ, Korkmaz KS, Sarioğlu S, K peliog lu A, Sakzlı M. Detecting p53 exon 7 mutations of colorectal carcinomas by restriction enzyme analysis. *Turkish Journal of Cancer*, 1998; 28(4): 174-178.
65. Lu X, Lane DP. The p53 Tumour Suppressor Gene. *Cell*, 1993; 75: 765-778.
66. Lane DP. The p53 Tumour Suppressor Gene. *Nature*, 1992; 358:15-16.
67. Hupp TR. New Treatments for cancer. *Cell*, 1992;71: 875-886.
68. Hupp TR. The p53 Tumour Suppressor Gene. *Nucleic Acids Research*, 1993; 21: 3167-3174.
69. Hupp TR. The p53. *Cell*. 1995; 83: 237-245.
70. Ball K. Tumour Suppressor Genes. *Current Biology*, 1996; 7: 71-80.
71. Bottger A. The p53 Tumour Suppressor Gene. *Journal of Molecular Biology*, 1997; 269: 744-756.
72. Daphi JD. p53: Biology and role for Cellular Radiosensitivity. *Strahlentherapie und Onkologie*, 2000; 176(6): 278-285.
73. Bush JA, Gang L. Anchorage-Independent Growth of p53-Knockout Dermal Fibroblasts is Revised by Wild-Type p53. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 2001.

74. www.edc.com/~jkimball/BiologyPages/A/Apoptosis.html.
75. Relaix F, Wei XJ, Li W, Pan J, Lin Y, Bowtell DD, Sassoon DA, Wu X. Pw1/Peg3 is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis. *Proceedings of the American Association of Cancer Research*, 2000; 97(5): 2105-2110.
76. Tuncer İ, Burgut R, Bozdemir N, Coşar EF (Editörler). *Türkiye’de Kanser sıklığı*. Adana, 1994
77. Kohler MF, Nishii H, Humphrey PA, Sasaki H, Marks J, Bast RC, Clarke-Pearson DL, Boyd J, Berchuck A. Mutation of the p53 tumor-suppressor gene is not a feature of endometrial hyperplasias. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1993, 169(3): 690-694
78. Pres MF, Jones LA, Godolphin W, Edwards CL, Slamon DJ: HER-2/neu oncogene amplification and expression in breast and ovarian cancers. *Progress in Clinical and Biological Research*, 1990; 354(A): 209
79. Bellacosa A, DeFeo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G, Masciullo V, Ferrandina G, Panici PB, Mancuso S, Neri G, Testa JR: Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *International Journal of Cancer*. 1995; 64: 280
80. Chambers SK, Wang Y, Gert RE, Kacinski BM. Macrophage colony-stimulating factor mediates invasion of ovarian cancer cells through urokinase. *Cancer Research*, 1995; 55: 1578
81. Di-Renzo MF, Olivero M, Katsaros D, Crepaldi T, Gaglia P, Zola P, Sismondi P, Comoglio PM. Overexpression of the Met/HGV receptor in ovarian cancer. *International Journal of Cancer*, 1994; 58: 658
82. Teneriello MG, Ebina M, Linnoila RI, Henry M, Nash JD, Park RC, Birrer MJ. p53 and Ki-ras gene mutations in epithelial ovarian neoplasms. *Cancer Research*, 1993; 53: 3103
83. Mazars R, Pujol P, Audelonde T, Jeanteur P, Theillet C. p53 mutations in ovarian cancer. A late event?. *Oncogene*, 1991; 6: 1685
84. Kohler MF, Marks JR, Wiseman RW, Jacobs IJ, Davidoff AM, Clarke-Pearson DL, Soper JT, Bast RC, Berchuck A. Spectrum of mutation and frequency of allelic deletion of the p53 gene in ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1993; 85: 1513
85. Mok SC, Chan WY, Wong KK, Muto MG, Berkowitz RS. SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells. *Oncogene*, 1996; 12: 1895
86. Mandai M, Konishi I, Koshiyama M, Mori T, Arao S, Tashiro H, Okamura H, Nomura H, Hiai H, Fukumoto M. Expression of metastasis-related nm23-H1 and nm23-H2 genes in ovarian carcinomas. Correlation with clinicopathology, EGFR, c-erbB-2 and c-erbB-3 genes and sex steroid receptor expression. *Cancer Research*, 1994; 54: 1825

87. Mok SC, Chan WY, Wong KK, Cheung KK, Lau CC, Ng SW, Baldini A, Colitti CV, Rock CO, Berkowitz RS. DOC-2, a candidate tumor suppressor gene in human epithelial ovarian cancer. *Oncogene*, 1998; 16: 2381.
88. Schultz DC, Vanderveer L, Berman BD, Hamilton TC, Wong AJ, Godwin AK. Identification of 2 candidate tumor suppressor genes on chromosome 17.p13.3. *Cancer Research*, 1996; 56: 1997
89. Abdollahi A, Godwin AK, Miller PD, Getts LA, Schultz DC, Taguchi T, Testa JR, Hamilton TC. Identification of a gene containing zinc-finger motifs based on lost expression in malignantly transformed rat ovarian surface epithelial cells. *Cancer Research*, 1997; 57: 2029
90. Kim TM, Benedict WF, Xu H-J, Hu S-X, Gosewehr J, Velicescu M, Yin E, Zheng J, D'ablaing G, Dubeau L. Loss of heterozygosity on chromosome 13 is common only in the biologically more aggressive subtypes of ovarian epithelial tumors and is associated with normal retinoblastoma gene expression. *Cancer Research*, 1994; 54: 605
91. Dodson MK, Cliby WA, Xu H-J, DeLacey KA, Hu S-X, Keeney GL, Li J, Podratz Kc, Jenkins RB, Benedict WF. Evidence of functional RB protein in epithelial ovarian carcinomas despite loss of heterozygosity at the RB locus. *Cancer Research*, 1994; 54: 610
92. Edelson MI, Lau CC, Colitti CV, Welch WR, Bell DA. A one-centimorgan deletion unit on chromosome Xq12 is commonly lost in berderline and invasive epithelial ovarian tumors. *Oncogene*, 1998; 16: 197
93. Turner HH. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck and cubitus valgus. *Endocrinology*, 1938; 23: 566
94. Klein CB, Conway K, Wang XW, Bhamra RK, Lin XH, Cohen MD, Annab L, Barrett JC, Costa M. Senescence of nickel-transformed cells by an X chromosome. Possible epigenetic control. *Science*, 1991; 251: 796
95. Wang XW, Lin X, Klein CB, Bhamra RK, Lee YW, Costa M. A conserved region in human and Chinese hamster X chromosomes can induce cellular senescence of nickel-transformed Chinese hamster cell lines. *Carcinogenesis*, 1992; 13: 555
96. Kurman RJ, Trimble CL. The behavior of serous tumors of low malignant potential. Are they ever malignant?. *International Journal of Gynecology and Pathology*, 1993; 12: 120
97. Kohler MF, Kerns BJM, Humphrey PA, Marks JR, Bast RC, Berchuck A. Mutation and Overexpression of p53 in Early-Stage Epithelial Ovarian Cancer. *Obstetrics and Gynecology*, 1993;81(5): 643-650.
98. Levesque MA, Lianidou ES, Angelopoulou K, Yu H, Genta F, Durando A, Massobrio M, Bharaj B, Diamandis EP, Katsaros D. Mutational Analysis Versus ELISA For The Detection of p53 Gene Abnormalities in Ovarian Carcinoma. *Proceedings of the American Association of Cancer Research*, 1998; 39

99. Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia: A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients. *Cancer*, 1985; 56: 403
100. Hendrickson M, Ross J, Eifel P, Martinez A, Kempson R. Uterine papillary serous carcinoma a highly malignant form of endometrial adenocarcinoma. *American Journal of Surgical Pathology*, 1982; 6: 93
101. Imamura T, Arima T, Kato H, Miyamoto S, Sasazuki T, Wake N. Chromosomal deletions and K-ras gene mutations in human endometrial carcinomas. *International Journal of Cancer*, 1992; 51: 47
102. Jones MH, Koi S, Fujimoto I, Hasumi K, Kato K, Nakamura Y. Allelotype of uterine cancer by analysis of RFLP and microsatellite polymorphisms.: Frequent loss of heterozygosity on chromosome arms 3p, 9q, 10q, 17p. *Genes Chromosomes & Cancer*, 1994; 9: 119
103. Fujino T, Risinger JI, Collins NK, Liu F-S, Nishii H, Takahashi H, Westphal E-M, Barrett JC, Sasaki H, Kohler MF, Berchuck A, Boyd J. Allelotype of endometrial carcinoma. *Cancer Research*, 1994; 54: 4294
104. Peiffer SL, Herzog TJ, Tribune DJ, Mutch DG, Gersell DJ, Goodfellow PJ. Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Research*, 1995; 55: 1922
105. Okamoto A, Sameshima Y, Yamada Y, Teshima S-I, Terashima Y, Terada M, Yokota J. Allelic loss on chromosome 17p and p53 mutations in human endometrial carcinoma of the uterus. *Cancer Research*, 1991; 51: 5632
106. Schildkraut JM, Risch N, Thompson WD. Evaluating genetic association among ovarian, breast and endometrial cancer: Evidence for a breast/ovarian cancer relationship. *American Journal of Human Genetics*, 1989; 45: 521
107. Watson P, Lynch HT. The tumor spectrum in HNPCC. *Anticancer Research*, 1994; 14: 1635
108. Watson P, Vasen HFA, Mecklin JP, Jarvinen H, Lynch HT. The risk of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *The American Journal of Medicine*, 1994; 96: 516
109. Ohwada M, Suzuki M, Kohno T, Saga Y, Takei Y, Jobo T, Kuramoto H, Sato I. Involvement of microsatellite instability in lymph node metastasis of endometrial carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2002; 132: 152-155
110. Musio A, Mariani T, Vezzoni P, Frattini A. Heterogeneous gene distribution reflects human genome complexity as detected at the cytogenetic level. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2002; 134: 168-171.
111. Musio A, Mariani T. Chromosomes, genes and cancer breakpoints. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2002; 139: 141-142.

112. Deger RB, Faruqi ShA, Noumoff JS. Karyotypic Analysis of Malignant Epithelial Ovarian Tumors. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1997; 96: 166-173.
113. Argüden YT, Hachanefioğlu S. Kanser Sitogenetiği. *Klinik Gelişim*, 2000; 13: 330-335
114. Mandahl N. Methods in solid tumour cytogenetics. In: Rooney DE, Czepulkowski BH (eds). *Human Cytogenetics. Vol II, Malignancy and acquired abnormalities, A practical Approach*. New York: Oxford University Press, 1992
115. Thompson FH. Cytogenetic methods and findings in human solid tumors. In: Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck J (eds). *The ACT Cytogenetics Laboratory Manual*. 3rd Ed., Philadelphia, Lippincott Raven Publishers, 1997
116. Heim S, Mitelman F (eds). *Cancer Cytogenetics*. 2nd Ed., New York: Wiley-Liss, 1995
117. Hodgson SV, Maher Er (eds). *A practical Guide to Human Cancer Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press, 1993
118. Ruddon Wr (ed). *Cancer Biology*. 3rd Ed., New York: Oxford University Press, 1995
119. Therman E (ed). *Human Chromosomes: Structure, Behaviour Effects*. 2nd Ed., New York: Springer-Verlag, 1986
120. Karger S, ISCN (1995). Mitelman F (ed). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, 1995
121. Fu SB, Li P, Feng XL, Liu CX, Liu QZ. The origin of isochromosomes and their significance in tumorigenesis of human lung cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1994; 74: 120-122
122. Mertens F, Johansson B, Mitelman F. Isochromosomes in neoplasia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 1994; 10: 221-230
123. Taetle R, Aickin M, Yang LM, Panda L, Emerson J, Roe D, Adair L, Thompson F, Liu Y, Winsler L, Davis JR, Trent J, Alberts DS. Chromosome abnormalities in ovarian adenocarcinoma: I. Nonrandom chromosome abnormalities from 244 cases. *Genes Chromosomes & Cancer*, 1999; 25(3): 290-300.
124. Wang JCh, Masson AMM, Tonin PN, Provencher, Eydoux P. Trisomy of Chromosome 10 in Two Cases of Ovarian Carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2000; 118: 65-68.
125. Thompson FH, Taetle R, Trent JM, Liu Y, Massey-Brown K, Scott KM, Weinstein RS, Emerson JC, Alberts DS, Nelson MA. Band 1p36 Abnormalities and t(1;17) in Ovarian Carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1997; 96: 106-110
126. Kohlberger PD, Kieback DG, Mian C, Wiener H, Kainz Ch, Gitsch G, Breitenacker G. Numerical Chromosomal Aberrations in Borderline, Bening and Malignant Epithelial Tumors of the

Ovary: Correlation With p53 Protein Overexpression and Ki-67. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 1997; 4(5): 262-264.

127. Laxman R, Currie JL, Kurman RJ, Dudzinski M, Griffin CA. Cytogenetic Profile of Uterine Sarcomas. *Cancer*, 1993; 71(4): 1283-1288.
128. Couturier J. Uterus: Endometrial Carcinoma. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* (Electronic Journal), 1999. Erisim: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Tumors/endometrID5045.html>
129. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989
130. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 1988; 16(3): 125.
131. <http://info.med.yale.edu/mutbase/hump53g.txt>.
132. Lazarus Ph, Stern J, Zwiebel, Fair A, Richie JP, Stimson S, Jr. Relationship between p53 mutation incidence in oral cavity squamous cell carcinomas and patient tobacco use. *Carcinogenesis*, 1996; 17(4): 733-739.
133. Enomoto T, Fujita M, Inoue M. Alterations of the p53 tumor suppressor gene and its association with activation of the c-K-ras-2 protooncogene in premalignant and malignant lesions of the human uterine endometrium. *Cancer Research*, 1993; 53: 1883-1888.
134. Milner BJ, Allan LA, Eccles DM. p53 mutation is a common genetic event in ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 1993; 53: 2128-2132.
135. Okamoto A, Sameshima Y, Yokoyama S. Frequent allelic losses and mutations of the p53 gene in human ovarian cancer. *Cancer Research*, 1991; 51: 5171-5176.
136. Okamoto A, Sameshima Y, Yameda Y. Allelic loss on chromosome 17p and p53 mutations in human endometrial carcinoma of the uterus. *Cancer Research*, 1991; 51: 5632-5636.
137. Mok CH, Tsao SW, Knapp RC, Fishbaugh PM, Lau CC. Unifocal origin of advanced human epithelial ovarian cancers. *Cancer Research*, 1992; 52: 5119-5122.
138. The restriction map v1.0, copyright 1994-1995 Microsoft Corporation, Dr BJ Murray and Dr C Schaefer, Designed and Written for Boehringer Mannheim GmbH.
139. Rooney DE, Czepulkowski BH. Prenatal diagnosis and tissue culture. In *Human Cytogenetics*, 1993; I: 55-89.
140. Köhler A. Chromosome staining In: Wegner RD. Ed. *Diagnostic Cytogenetics*, Berlin: Springer-Verlag; 1999: 56-60.

141. <http://www.oncodx.com/cancers/endometrial.htm>. Erişim: 03.10.2003
142. Zhou XT, XU BH, Chu CL, Xia GF, Li N, Sha R. Human chromosome hot points at 3p14 in three populations. *Human Genetics*, 1984; 67(3): 249-251
143. Bodmer D, Janssen I, Jonkers Y, van den Berg E, Dijkhuizen T, Rychter MD, Schoenmakers E, van Kessel AG. Molecular cytogenetic analysis of clustered sporadic and familial renal cell carcinoma-associated 3q13-q22 breakpoints. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2002; 136: 95-100
144. Dubourg Ch, Toutain B, Helias C, Henry C, Lessard M, Le Gall J-Y, Le Treut A, Guenet L. Evaluation of ETF1/eRF1, mapping to 5q31, as a candidate myeloid tumor suppressor gene. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2002; 134: 33-37
145. Guenet L, Henry C, Toutain B, Dubourg C, Le Gall JY, David V, Le Treut A. Eucaryotic translation termination factor gene (ETF1/eRF1) maps at D5S500 in a commonly deleted region of chromosome 5q31 in malignant myeloid diseases. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 2000; 88: 82-86
146. Pennachio LA, Rubin EM. Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences. *Nature Reviews Genetics*, 2001; 2: 100-109
147. Özışık YY, Meloni AM, Surti U, Sandberg A. Deletion 7q22 in uterine leiomyoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1993; 71: 1-6
148. Van de Ven W. Four cytogenetic subgroups can be identified in endometrial polyps. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1995; 84: 153
149. Karaüzüm SB, Lüleci G, Özbilim G, Erdoğan A, Kuzucu A, Demircan A. Cytogenetic Findings in Thirty Lung Carcinoma Patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1998; 100: 114-123
150. Rao PH, Mathew S, Kelsen DP, Chaganti RSK. Cytogenetics of Gastric and Esophageal Adenocarcinomas 3q Deletion as a Possible Primary Chromosomal Change. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1995; 81: 139-143
151. Forrest DL, Lee ChLY. Constitutional rearrangements of 7q22 in hematologic malignancies: a new case report. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2002; 139: 75-77
152. Brown TA. *Gene Cloning, An Introduction*. 3rd Ed., UMIST, Manchester, UK: Chapman & Hall, 1995: 27-77.
153. Aksoy K, Kayrın L, Tuli A, Attila G, İnal TC, Yalım E. *Tanıda DNA Teknikleri Yaz Okulu IV Kitapçığı*. 2000; 32-42.
154. Erdem H. Mutasyon Analiz Yöntemleri. *Medikal Biyoteknoloji ve Moleküler Tıp Dergisi*, 1996; 1 (3): 107-111.

155.Solak M, Bağcı H, Őengil AZ, Öztaő S. *Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi*, 2000; 117-123.



8. EKLER

KULLANILAN KİMYASALLAR, SOLÜSYONLAR VE HAZIRLANMASI

Aşağıda verilen kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak “Molecular Cloning”¹²⁹ ve “Human Cytogenetics”¹³⁹ esas alınmıştır.

Hazırlanan solüsyonlar genelde konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarını elde etmek için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilir. Konsantrasyon dönüştürmelerinde basitçe şu formülden yararlanıldı;

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

M_1 = Hazırlanan stok konsantrasyon (M, N veya %).

V_1 = Stoktan alınması gereken miktar (v).

M_2 = Çalışma (son) konsantrasyonu (M,N veya %).

V_2 = Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (v).

EK-1

MOLEKÜLER ÇALIŞMALARDA KULLANILAN SOLÜSYONLAR ve YÖNTEMLER

1.1. STE

100 mM NaCl

50 mM Tris-HCl (pH: 7.5)

1 mM EDTA

İstenen hacimde STE hazırlamak için final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde gerekli 0.5 M EDTA miktar hesaplanarak alınır. 0.5 M tris-HCl'den de final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde gerekli miktar hesaplanarak alınır. Final konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde NaCl tartılır ve bu üç bileşen temiz şişede bir miktar su ile çözülür. pH ayarlandıktan sonra gerekli hacme tamamlanır, otoklavlanır ve 4°C'de saklanır.

1.2. SDS SOLÜSYONU

% 10 SDS

20 ml için; 2 gr SDS tartılır, bir şişeye aktarıldıktan sonra üzerine 20 ml steril saf su ilave edilir ve iyice (pelet eriyinceye kadar) vortekslenir. Kullanılınca kadar buzdolabında veya oda ısısında tutulabilir.

1.3. DNA'NIN KONSANTRASYON VE SAFLIĞININ ÖLÇÜLMESİ

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve kesim gibi reaksiyonlar hazırlanırken her bir örneğe ait DNA'nın miktarını ve saflığını bilmek önemlidir. 260 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunan her absorbans değeri 50 µg/ml DNA miktarına karşılık gelmektedir. Bu absorbans değeri DNA'nın saflık değerini kontrol etmek amacıyla da kullanılabilir. Saf bir DNA örneğinde spektrofotometrede 260 ve 280 nm' deki absorbans oranı $A_{260}/A_{280}=1.8$ dir. Bu değerden düşük değerler proteinlerle, büyük değerler ise RNA ile kontaminasyonu göstermektedir^{129,152,153,154}.

1.4. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

Bir su yosunundan elde edilen agaroz, D-Galaktoz ve 3,6-anhidro L-Galaktoz birimlerinin lineer polimerdir.

Agaroz jeller, uygun tamponla berrak bir çözelti elde edene kadar ısıtılıp kaynatma yoluyla hazırlanır. İçine 0.5µl/ml oranında ethidium bromide (EtBr) eklenerek jel dökme kabına dökülür ve katılaşmaya bırakılır. Katılaştıktan sonra jel, yoğunluğu agarozun konsantrasyonu ile belirlenen bir matriks oluşturur. Jel boyunca elektrik akımı uygulandığı zaman, nötral pH da negatif yüklü olan DNA, anoda doğru göç eder. Göç oranı birçok parametre ile belirlenir^{129,152,153,154,155}.

a) DNA'nın moleküler büyüklüğü

Lineer çift iplikli DNA molekülleri bir elektrik alanında bir bütün halinde hareket etme eğilimindedir. Jel matriksi boyunca baz çifti sayısının 10 tabanına göre logaritması (\log_{10}) ile ters orantılı bir oranda göç eder. Büyük moleküller sürtünme direncinden ötürü daha yavaş hareket ederler ve porlar boyunca katettikleri yolu küçük moleküllere oranla daha fazla ısıtırlar.

b)Agaroz Konsantrasyonu

Bilinen büyüklükte lineer bir DNA parçası farklı agaroz konsantrasyonlarındaki jellerde farklı oranda göç eder. Jel konsantrasyonu (Υ) ile DNA'nın elektroforetik hareketinin logaritması (μ) arasında aşağıdaki eşitlikle tanımlanan lineer bir ilişki mevcuttur:

$$\text{Log } \mu = \text{Log } \mu_0 \cdot K_r \Upsilon$$

μ_0 : DNA'nın serbest elektroforetik hareketi ve

K_r : Gecikme sabitesi (Jelin özelliklerine, büyüklüğüne ve göç eden molekülün göç şekline bağlı sabit bir sayıdır).

Farklı jel konsantrasyonlarını kullanarak büyüklüğüne göre geniş bir aralıktaki DNA moleküllerini ayırtmak mümkündür (Çizelge 18).

Çizelge 18. Farklı miktarlarda Agaroz içeren jellerin ayırma aralığı

Jeldeki Agaroz Miktarı (% [w/v])	Lineer DNA molekülünün etkili ayırma aralığı (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

c) DNA nın konformasyonu

Aynı moleküler ağırlıktaki süperhelikal sirküler (form I), çentikli sirküler (form II) ve lineer DNA, agaroz jellerde farklı oranlarda göç eder. Üç formun rölatif hareketi primer olarak jeldeki agaroz konsantrasyonuna bağlıdır, fakat uygulanan akımın gücü, tamponun iyonik gücü ve form I DNA nın süperhelikal kıvrımlarının yoğunluğu da bu hareketi etkilemektedir. Aynı şartlar altında form I DNA, form II DNA dan daha hızlı göç eder; farklı şartlar altında ise durum tam tersidir.

d) Uygulanan voltaj

Düşük voltajlarda, lineer DNA parçalarının göç oranı uygulanan voltajla orantılıdır. Yani agaroz jellerde etkili ayırma oranı voltaj arttıkça azalmaktadır. 2 kb'dan daha büyük DNA parçalarını maksimum oranda ayırtırmak için agaroz jellere 5 V/cm den daha fazla voltaj uygulanmamalıdır. Mesafe jelin uzunluğu olarak değil, elektrodlar arasındaki en kısa yol olarak ölçülmelidir.

e) Elektrik akımının yönü

50-100 kb'dan daha büyük DNA molekülleri elektrik akımının yönü sabit kalırsa agaroz jelde aynı oranda göç ederler. Bununla birlikte elektrik akımının yönü periyodik olarak değiştirilerek DNA moleküllerinin zorunlu olarak yönlerini değiştirmesi sağlanır. Daha büyük olan DNA moleküllerinin yeni akım yönüne uyum sağlamaları daha uzun zaman alır. Pulsed-field jel elektroforezi ekstrem büyüklükteki DNA molekülü popülasyonunu ayırmak için kullanılabilir.

f) Baz kompozisyonu ve ısı

Poliakrilamid jellerin aksine agaroz jellerde DNA'nın elektroforetik davranışı, DNA'nın baz kompozisyonu veya elektroforez esnasındaki ısıdan pek etkilenmez. Yani agaroz jellerde, farklı büyüklükteki DNA fragmanlarının elektroforetik hareketi 4-30°C arasında değişmez. Agaroz jel elektroforezi genelde oda ısısında yapılır. %0.5'ten daha az agaroz içeren jeller ve düşük kaynama ısılı agaroz jeller daha narindir ve zarar görmemeleri için elektroforezlerinin 4°C'de gerçekleştirilmesi daha iyi sonuç verir.

g) Boyaların etkisi

Ethidium bromid, agaroz ve poliakrilamid jellerde DNA'yı gözlemek için kullanılan floresan bir boyadır ve lineer DNA'nın elektroforetik hareketini %15 oranında azaltır. Boya, baz çiftlerinin arasına girerek lineer ve çentikli sirküler DNA moleküllerinin boyunu uzatarak onları daha rijit hale getirir.

h) Elektroforez tamponunun kompozisyonu

Elektroforez tamponunun iyonik gücü ve kompozisyonu DNA'nın elektroforetik hareketini etkiler. Ortamda iyonlar olmazsa elektriksel iletkenlik minimal düzeydedir ve DNA oldukça yavaş hareket eder. Yüksek iyonik güce sahip tamponlarda (10X elektroforez tamponu yanlışlıkla kullanılırsa) elektriksel iletkenlik oldukça etkili olur ve

önemli oranda ısı ortaya çıkar. Daha da kötüsü jel kaynar ve DNA denatüre olur. Çift iplikli DNA'nın elektroforezi için kullanılabilen çeşitli tamponlar mevcuttur. Elektroforez tamponları genellikle konsantre çözeltiler olarak hazırlanırlar ve oda ısısında saklanırlar.

1) Agaroz jel elektroforezinin hazırlanması

Agaroz hazırlanmasında öncelikli olarak jel döküm tablasının boyutları (jel kalınlığı da dikkate alınarak) ölçülür ve hacmi belirlenir. Hazırlanmak istenen yüzde konsantrasyona göre (örn. %2.5'lük) belirlenen hacim için gereken miktar agaroz dikkatli bir şekilde tartılır ve erlen içine konur. Üzerine hesaplanan hacimde 1X TBE tamponu (1 hacim 5X TBE üzerine 4 hacim saf su ilave edilerek hazırlanır) konularak bek alevine veya mikrodalga fırına alınır ve eritilir (Çok kısa süreli bir kaynama yeterlidir). Bunu takiben jelin içine son konsantrasyon 0.5µg/ml olacak şekilde stok EtBr solüsyonundan ilave edilir. Jel sıcaklığı 45-50°C'de (el yakmayacak sıcaklığa) geldiğinde hazırlanan jel kabına dikkatli bir şekilde, hava kabarcığı oluşturmadan dökülür, kuyucuk oluşturmak için tarak yerleştirilir ve yaklaşık 30-45 dakika beklenerek polimerize olması sağlanır. Jel elektroforez tankına alınır ve üzeri örtülene kadar 1X TBE tamponu ilave edilir. Kuyucuk oluşturmak için yerleştirilen tarak jelin zedelenmemesi için dikkatli bir şekilde çıkartılır. Artık jel, örneklerin uygulanması için ve elektroforez için hazırdır.

1.5. TE-9

500 mM Tris baz

20 mM EDTA pH: 9.0

10 mM NaCl

Hazırlanacak hacim için kullanılacak olan tris, EDTA ve NaCl hesaplanarak tartılır, üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

1.6. KULLANILAN RESTRİKSİYON ENZİMLERİ ve ÖZELLİKLERİ

Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri, özellikleri ve çalışma şartları Çizelge 19'da verilmiştir.

Çizelge 19. Çalışmada kullanılan restriksiyon endonükleazlar, özellikleri ve çalışma şartları

	RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ					
	BspLU 11I	Mae III	Ita I	Msp I	Hinf I	
Tanıma Dizisi (5' →3')	A [↓] CATGT	[↓] GTNAC	GC [↓] NGC	C [↓] CGG	G [↓] ANTC	
İzoşomeri	—	—	Fnu4HI	Hpa II	—	
Çalışma Sıcaklığı	48°C	55°C	37°C	37°C	37°C	
Saklama Sıcaklığı	-20°C	-20°C	-20°C	-20°C	-20°C	
Kaynağı	Bacillus Species LU 11	Methanococcus Aeolicus PL-15/H	Ilyobacter tartaricus	Acinetobacter Iwoffii	Haemophilus İnfluenzae Rf	
İnaktivasyonu	EDTA (0.5 M)	EDTA (0.5 M)	65°C ta 10 dk	65°C ta 15 dk	EDTA (0.5 M)	
İnkübasyon Tamponu ve konsantrasyonu	10 X H	2 X Mae III inkübasyon t.	10 X H	10 X L	10 X H	
Hacim Aktivitesi (U/μl)	10	2	10	10	10	
Farklı DNA'larda Kesim Bölge Sayısı	λ	2	156	380	328	148
	PBR322	1	17	42	26	10
	pUC18	—	11	—	13	—
	pUC19	—	—	—	11	6
Firma	ROCHE	ROCHE	ROCHE	ROCHE	TaKaRa	

1.7. 0.5 M EDTA (pH: 7.5 ve 8.0)

İstenen hacimlerde 0.5M olacak şekilde gerekli EDTA tartılır, bir miktar su ile çözülür, NaOH ile pH'lar ayarlandıktan sonra gerekli hacme tamamlanır, otoklavlanır (121°C'de 15-20 dakika) ve 4°C'de saklanır.

1.8. YÜKLEME TAMPONU (6X)

%40 sukroz (w/v), (suda çözülür)

%0.25 bromfenol mavisi

Yukarıda verilen oranlara göre, istenen hacim için gereken miktarda sukroz ve boya tartılır, vorteksle iyice karıştırılır ve ependorflara paylaştırılarak 4°C'de saklanır. DNA solüsyonu ile 1/5 oranında (1hacim boya 5 hacim DNA solüsyonu) karıştırılır.

1.9. POLİAKRİLAMİT JEL ELEKTROFOREZİ

Genellikle amonyum persülfattan sağlanan serbest radikallerin varlığında ve TEMED (N, N, N', N', tetrametiletillen-diamin) in stabilize edici etkisi altında akrilamit monomerlerinin uzun zincirler halinde polimerize olması sağlanır. İki fonksiyonlu bir ajan olan N, N'-metilenbisakrilamit, polimerizasyon reaksiyonuna katıldığı zaman lineer akrilamit zincirlerini, çapraz bağlayarak jeli oluşturur. Jelin gözenekliliğini zincirlerin uzunluğu ve çapraz bağlanma oranı belirler. Zincirlerin boyunu belirleyen, polimerizasyon reaksiyonundaki akrilamidin konsantrasyonudur (%3.5-20). Reaksiyon, her 29 akrilamit monomeri için 1 molekül çapraz bağlayıcı yani bisakrilamit içermelidir^{129,153}. Nondenatüran jellerde farklı poliakrilamit konsantrasyonlarındaki etkili ayırma aralığı Çizelge 20'de gösterilmiştir.

Çizelge 20. Poliakrilamit jelde DNA'ların etkili ayırma aralığı

AKRİLAMİT ^a (%w/v)	ETKİLİ AYIRMA ARALIĞI (bç)
3.5	1000-2000
5.0	80-500
8.0	60-400
12.0	40-200
15.0	25-150
20.0	6-100

^a: Reaksiyon N,N'-metilenbisakrilamiti, akrilamit konsantrasyonunun 1/30 u oranında içermelidir.

Poliakrilamit jellerin hazırlanması ve elektroforezi agaroz jele oranla oldukça zahmetlidir. Karışım, spacerlerle ayrılmış, ve alttan akması önlenmiş iki cam arasına dökülür. Poliakrilamit jeller, gerekli olan ayırma bağı olarak 10-100 cm arasında değişen uzunluklarda olabilir. Poliakrilamit jeller istisnasız olarak dikey çalışılırlar. Agaroz jellerle kıyaslamada üç temel avantaja sahiptirler:

- (1) Ayırma güçleri o kadar büyüktür ki uzunlukları sadece % 0.2 oranında değişen (örneğin 500 bç'de 1bç) DNA moleküllerini bile ayırabilir.
- (2) Tek bir poliakrilamit kuyusuna uygulanabilen DNA miktarı hem agaroz göre daha fazladır ve hem de rezolüsyonda bir fark yoktur.
- (3) DNA jelden daha saf ve çeşitli amaçlara uygun olarak izole edilebilir.

Yaygın kullanımda olan iki tip poliakrilamit jel mevcuttur:

- Çift iplikli DNA fragmanlarının purifikasyonu ve ayırımı için kullanılan nondenatüran poliakrilamit jeller:

Bu jeller, polimerize olduktan ve örnekler uygulandıktan sonra 1X TBE'de ve düşük voltaj da (1-8 V/cm) elektroforeze tabi tutulurlar. Elektrik akımı nedeniyle oluşan ısının küçük DNA fragmanlarını denatüre etmesini önlemek amacıyla düşük voltaj uygulanır.

20 cmX40 cm'lik cam plakları tutmak üzere dizayn edilmiş birçok vertikal elektroforez tankı, ticari kaynaklardan sağlanabilir. Uygun tanklarla daha büyük veya daha küçük jellerin de kullanımı mümkündür. Spacer'lar 0.5-2 mm arasında değişebilen inceliktedir. Jel ne kadar kalın ise elektroforez esnasında o kadar fazla ısınır. Fazla ısınma kuyruklu DNA bantlarına ve daha başka problemlere sebep olur. Bu yüzden daha keskin ve yassı DNA bantlarına imkan tanıdığından ince jeller tercih edilir. Ayrıca büyük miktarlarda DNA hazırlamak gerektiğinde (1 µg/bant) daha kalın jeller kullanmak gereklidir.

a. %40 Poliakrilamit

38.6 gr akrilamit

1.3 gr N, N'-metilenbisakrilamit

H₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

100 ml %40'luk poliakrilamit solüsyonu hazırlamak için yukarıda verilen miktarlarda kimyasallar tartılır ve toplam hacimden biraz az saf su ile çözülür. Kimyasallar çözününce saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlanır. Kimyasalların iyice çözünmesi için solüsyon 37°C'de su banyosunda bir süre bekletilir. 0.22 µm por çapına sahip steril filtreden süzülüp steril edilir ve oda ısısında saklanır.

Uyarı: Akrilamit, potansiyel bir nörotoksindir ve deri yoluyla absorbe edilir. Toz halindeki akrilamit ve metilenbisakrilamit tartılırken maske takılıp, eldiven giyilmelidir. Bu kimyasalları içeren çözeltiler ile çalışırken eldiven kullanılmalıdır. Poliakrilamit çözeltisi nontoksik olsa da çok az miktarlarda polimerize olmamış akrilamit içerebileceği ihtimaline karşılık dikkatli çalışılmalıdır.

b. 1X TBE

89 mM Tris-borat

2 mM EDTA (pH: 8.0)

TBE genellikle 5X stok çözeltisi olarak hazırlanır ve saklanır. Tamponun pH'sı yaklaşık olarak 8.3 civarında olmalıdır.

c. %25 Amonyum Per Sülfat (APS)

0.125 gr APS

Saf su ile 0.5 ml'ye tamamlanır

1,5 ml' lik temiz bir ependorf tüpüne yukarıda belirtilen miktarda APS tartılır ve üzerine saf su eklenir. Karışım vortekslenir ve iyice çözülmesi için 37°C'de su banyosunda bir süre bekletilir. 4°C'de 1-2 hafta saklanabilir.

d. 5X TBE

Bir litre için;

54 gr Tris baz

27.5 gr Borik asit

0.01 M EDTA (pH: 8.0)

Hazırlanmak istenen miktar için gereken bileşenler yukarıdaki değerlere göre orantılanarak alınır. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözülür, NaOH ile pH 8.0'e ayarlanır ve otoklavlanır.

1X yapmak için 1 hacim 5X'lik TBE üzerine 4 hacim saf su ilave edilir.

e. EtBr (10 mg/ml)

Hazırlanacak hacim için gereken miktar Ethidium Bromid (EtBr) dikkatli bir şekilde tartılır ve suda iyice vortekslenerek çözülür. Işığa hassas olduğu için renkli bir cam şişede veya alüminyum folyo ile sarılarak 4°C'de saklanır. Jele son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde ilave edilir.

EtBr, floresan bir boyadır ve DNA ve RNA'nın bazıları arasına girerek kuvvetlice bağlanır. UV ile parlayarak görüntü verir ve jeldeki nükleik asitlerin yerinin belirlenmesini sağlar.

Ayrıca EtBr son derece mutajen bir maddedir. Tartım ve kullanım sırasında mutlaka eldiven ve maske giyilmelidir ve çevreyi de kontamine etmeden dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır.

EK-2

SİTOGENETİK ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİNİN HAZIRLANIŞI

2.1. Yıkama Besiyeri

- 100 ml F-10 HAM's
- 2.3 cc Penicillin-Streptomycin
- 1 cc HEPARİN
- 0.2 cc Gentamycin

2.2. Chang medyum

Irvine Scientific firmasından sağlanan Chang in situ medyum, bir doku kültürü medyumunun serum dahil tüm bileşenlerini içermektedir. Bu nedenle yeni açılan medyum şişesine sadece %1.2 oranında antibiyotik eklenerek kullanılmıştır (100 ml'lik medyuma 1.2 ml penicillin-streptomycin).

EK-3

SİTOGENETİK ÇALIŞMADA BANTLAMA İÇİN KULLANILAN SOLÜSYONLAR

3.1. Tripsin solüsyonu (Stok solüsyon, 30 mg/ml)

3 gr tripsin, 100 ml % 0.9'luk NaCl içerisinde çözülür. 1.5 ml'lik kısımlara ayrılarak -20°C'de saklanır.

3.2. %0.9'luk NaCl (Sodyum klorid)

Ticari olarak satılan steril serum fizyolojik kullanılmıştır.

3.3. Fosfat tamponu

İki ayrı solüsyon halinde hazırlanır ve eşit oranda karıştırılır.

Solüsyon 1. 9.073 gr KH_2PO_4 tartılıp 1000 ml bidistile suda çözülür.

Solüsyon 2. 11.87 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1000 ml bidistile suda çözülür.

3.4. Giemsa boya solüsyonu

Fosfat tamponu içerisinde % 7-10 oranında olacak şekilde hazırlanır.

9. ÖZGEÇMİŞ

1963 yılında Adana'nın Yüreğir ilçesinde doğdu. İlk öğrenimini Adana'da Yamaçlı İlkokulunda, orta öğrenimini Karşıyaka Kız Sanat Ortaokulunda ve lise öğrenimini Adana Karşıyaka Lisesinde tamamladı. 1980 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve buradan 1985 yılında mezun oldu. 30 Temmuz 1986 tarihinde Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Uzman kadrosunda göreve başladı. 1988 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programını kazandı. 1992 yılında yüksek lisans programını tamamladı. 1998 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı doktora programını kazandı. "Prenatal Tanıda Amniyosentez, CVS ve Karyotip Analizi" konulu laboratuvar tekniklerini öğrenmek üzere 1 Mart 1999 tarihinden itibaren 1.5 ay süreyle Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bilim Dalında bulundu. Halen Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında uzman kadrosunda görevini yürütmektedir.

Evli ve 2 çocuk annesidir.