

KOLON KANSERİ TANILI OLGULARDA PCR-RFLP
METODU İLE *p53* GEN MUTASYONLARININ
SAPTANMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Emine DURHAN
Danışman
Yrd. Doç Dr. Serap TUTGUN ONRAT
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEMMUZ 2006

“Bu tez çalışması “042.FENED.03” numaralı proje olarak A.K.Ü BAPK tarafından desteklenmiştir.”

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLON KANSERİ TANILI OLGULARDA PCR-RFLP METODU
İLE *p53* GEN MUTASYONLARININ
SAPTANMASI

Emine DURHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman
Yrd. Doç. Dr. Serap TUTGUN ONRAT

AFYON
2006

EMİNE DURHAN'nın yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "KOLON KANSERİ TANILI OLGULARDA PCR-RFLP METODU İLE p53 GEN MUTASYONLARININ SAPTANMASI" başlıklı bu çalışma, lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

... / ... /

Jüri Üyesi : Prof. Dr. MUHSİN KONUK
(Başkan)



Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. SERAP TUTGUN ONRAT
(Danışman)



Jüri Üyesi : Doç. Dr. CEVDET UĞUZ



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nunGün
vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
GRAFİKLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolon Kanseri Biyolojisi	3
2.2. Benign ve Malign Tümörlerin Özellikleri	5
2.2.1. Farklılaşma ve Anaplazi	5
2.2.2. Büyüme Hızı	6
2.2.3. İnvazyon	6
2.2.4. Metastaz	6
2.3. Metastaz Yolları	7
2.3.1. Vücut Boşlukları ve Yüzeyleri Yoluyla Yayılma	7
2.3.2. Lenf Damarları Yoluyla Yayılma	8
2.3.3. Kan Damarları Yoluyla Yayılma	8
2.4. Kanserin Genetik Yapısı	9
2.4.1. Onkogenler	12
2.4.2. Tümör Supressör Genler	13
2.4.3. DNA Tamir Genleri (DNA Mismatch Repair Genes)	16
2.5. Kolon Kanseri	19
2.5.1. Polipler	19
2.5.1.1. Poliplerin Sınıflandırılması	19
2.5.1.1.1. Klinik Sınıflama	19
2.5.1.1.2. Endoskopik Sınıflama.....	19

2.5.1.2. Poliplerin Histolojik Sınıflandırması.....	20
a) Sporadik Polipler	20
a-1. Non neoplastik olanlar	20
1) Hiperplastik polipler (Metaplastik)	20
2) İnflamatuvar polipler	21
3) Jüvenil polipler	21
4) Lenfoid polipler	21
a-2. Neoplastik olanlar	21
b) Herediter Polipler ve Polipozisler	21
b-1. Non-neoplastik polipler	21
b-2. Herediter neoplastik polipler	22
2.6. Kolon Kanserinin Sınıflandırılması	23
2.6.1. Kalıtsal Sendromlar	23
2.6.1.1. Ailesel Adenoma Poliposis (FAP)	23
2.6.1.2. Kalıtsal Polipsiz Kolorektal Kanser (HNPCC-Herediter Non-Poliposis Colorectal Cancer-Lynch Syndrom)	25
2.6.2. Sporadik Sendromlar	29
2.6.3. Familial Sendromlar	29
2.7. Epidemiyolojisi	30
2.8. Kolon Kanserinde Gözlenen Sitogenetik Değişimler	33
2.9. Kolon Kanserlerinde Gözlenen Moleküler Genetik Değişimler	34
2.10. Tümör Gelişimi	37
2.11. Tümör Hücre Heterojenitesi	40
2.12. Kolon Kanserinde Derecelendirme sistemi	41
2.12.1. TNM Derecelendirme Sistemi	41
2.12.2. Evre Gruplaması.....	42
2.13. p53 Geni	46
2.14. p53 Gen Ürünü (proteini)	48
2.15. p53 Gen Fonksiyonu	49
2.16. p53 Protein Fonksiyonu	56
2.17. Wild-tip ve Mutant p53'ün Biyokimyasal Özellikleri	59

2.18. P53 Mutasyonu	60
2.19. Kolon Kanserinde p53 Mutasyonları	64
2.20. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	68
2.21. Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP)	70
3. MATERYAL ve METOD	72
3.1. MATERYAL.....	72
3.1.1. Parafine Gömülü Doku Örneklerinin Elde Edilmesi	72
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	74
3.1.3. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı	75
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	76
3.2. METOD.....	77
3.2.1.Parafine Gömülü Dokudan DNA İzolasyon Protokolü	77
3.2.2. PCR Optimizasyonu ve PCR Amplifikasyonu.....	78
3.2.3. Enzimatik Kesim.	83
3.2.4. Kullanılan İstatistik Metodu	84
4.BULGULAR	85
4.1. DNA İzolasyonu Sonuçları.....	85
4.2. PCR Optimizasyonu ve Sonucu	87
4.3. PCR Amplifikasyonu ve Enzim Kesimi Sonuçları	89
4.3.1. Yaş ve Cinsiyet Karşılaştırması.....	92
4.3.2. Cinsiyetlerin Arg72Pro ve G13064C Mutasyon Bulguları.....	92
4.3.3.Cinsiyet ve Tanı Bulguları	94
4.3.4.Yaş Gruplarının Arg72Pro ve G13064C Mutasyon Bulguları.....	95
4.3.5.Yaş Grupları ve Tanı	97
4.3.6. Taniya göre Arg72Pro ve G13064C Mutasyon Bulguları	98
4.3.7. Arg72Pro ve G13964C Polimorfizm için Frekans Değerlendirmesi	100
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	104
5.1. Örnekler, DNA İzolasyon ve PCR sonuçları Tartışması	106
5.2.Enzimatik Kesim Sonuçları.....	106
5.2.1. Yaş ve Cinsiyet Değerlendirmesi	107

5.2.2. Cinsiyetlerin Arg72Pro ve G13964C Mutasyon Sonuçları	107
5.2.3. Cinsiyet ve Tanı Sonuçları	108
5.2.4. Yaş Gruplarının Arg72Pro ve G13964C Mutasyon Sonuçları	109
5.2.5. Yaş Grupları ve Tanı Sonuçları	110
5.2.6. Tanıya göre Arg72Pro ve G13964C Mutasyon Sonuçları	110
5.2.7. Arg72Pro ve G13964C Mutasyon Değerlendirmesi	111
6. KAYNAKLAR	114
7. TEŞEKKÜR	124
8. ÖZGEÇMİŞ	125

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KOLON KANSERİ TANILI OLGULARDA PCR-RFLP METODU İLE *p53* GEN MUTASYONLARININ SAPTANMASI

Emine DURHAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç.Dr.Serap TUTGUN ONRAT

Kolon kanseri sporadik veya kalıtsal olabilen yaygın bir hastalıktır. Kanser oluşumunda etkili olan en önemli tümör süpressör gen *p53*'dür. Normal *p53* replikasyon sırasında DNA tamirini kolaylaştırarak hücre siklusunu G₁'de durmasına veya apoptosise (programlanmış hücre ölümü) neden olmasında rol oynar. Arg72Pro polimorfizm kolorektal kanserin erken evrelerinde ve belki cinsiyete ve bölgeye bağlı olarak invaziv hastalığa ilerlemede rol oynayabilir. *p53* intron 6'daki nükleotit değişimleri tümör gelişiminde ve *p53* fonksiyonun düzensizliğiyle ilişkili olduğu rapor edilmiştir. G13964C baz değişimi missense, nonsense ve splice bölge mutasyonu benzer dominant mutasyon olarak görev yapar.

Çalışmamızda 35 (20 kadın ve 15 erkek) kolon kanser teşhisi konmuş kolon kanser doku örneklerinden DNA izole edildi. Dokuları yaşları 40-90 arasında kadın (yaş ortalaması 65.95±2.76) ve yaşları 40-79 arasındaki erkek olmak üzere (61.67±3.07) kolon kanserli

35 olgudan toplandı. Parafine gömülü dokudan, EZNA Doku DNA Kiti kullanarak, genomik DNA elde edildi. G13964C (intron 6) varyantını belirlemek için PCR-RFLP metodunu kullanıldı. *p53* 4. eksonu PCR metodu ile amplifiye ettik ve BstFNI restriksiyon enzimi kullanarak 4. ekson için *p53* mutasyon analizi belirlendi. *p53* 6. varyantını PCR metoduyla amplifiye ettik ve BstHHI enzimini kullanarak 6. intron için *p53* mutasyonunu saptandı. Arg72Pro polimorfizmi için 2 (%7.4) olguda Pro/Pro, 14 (%51.9) olguda Arg/Arg ve 11 (% 40.7) olguda Arg/Pro genotiplerini bulundu. G13964C polimorfizmi için 7 (%23.3) olguda GG, 21 (%70.0) GC ve 2 (%6.7) olguda CC bulundu.

2006, 126 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kolon kanseri, *p53* geni, Ar72Pro, G13964C, PCR, RFLP, mutasyon, polimorfizm.

ABSTRACT

Ms.Sc

DETECTION OF *p53* GENE MUTATIONS BY USING PCR-RFLP METHOD IN CASES OF COLON CANCER

Emine DURHAN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Yrd.DoçDr. Serap TUTGUN ONRAT

Colon cancer is a common disease that can be sporadic or inherited. *p53* is the most important tumor suppressor gene that is effective in cancer formation. Normal *p53* acts by causing G₁ cell-cycle arrest to facilitate DNA repair during replication or to induce apoptosis (programmed cell death). Arg72Pro may play a role in the early stages of colorectal neoplasia and possibly in progression to invasive disease, depending on site and sex. Nucleotide alterations in *p53* intron 6 have been reported to be associated with the dysregulation of *p53* function and tumor development. G13964C base change functioned as dominant mutation similar to the more common missense, nonsense and splice-site mutations.

In this study, DNA was isolated from colon cancer tissue samples of (20 females and 15 males) 35 cases diagnosed to be colon carcinoma. Tissues were collected from 35 cases

with colon cancer ages of female 40-90 (mean age 65.95 ± 2.76) and ages of male 40-79 (mean age 61.67 ± 3.07). Genomic DNA was extracted from paraffin embedded tissues using EZNA Tissue DNA Kit (Omega) following the protocol. To detect the Arg72Pro region (exon 4) and G13964C variant (intron 6) PCR-RFLP assay was used. After then 4th exon of *p53* were amplified by PCR method and *p53* mutation analyses was performed by using BstFNI restriction enzyme determined for 4th exon. After then 6th variant of *p53* were amplified by PCR method and *p53* mutation analyses was performed by using BstHHI restriction enzyme determined for 6th intron. In 2 (%7.4) cases Pro/Pro, in 14 (%51.9) cases Arg/Arg and in 11 (% 40.7) Arg/Pro were found for Arg72Pro polymorphism. In 7 (%23.3) cases G/G, in 21 (%70.0) cases G/C and in 2 (%6.7) C/C were found for G13964C polymorphism

2006, 126 page

Key Words: Colon Cancer, *p53* gene, Ar72Pro, G13964C, PCR, RFLP, mutation, polymorphism.

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil no</u>	<u>Sayfa no</u>
2.1. Mukoza, submukoza, hücresel kası ve lenf nodlarını saran tumor dokusu	1
2.2. Kanser hücresi	2
2.3. Kolonun benign adenomatos polipleri	6
2.4. Kolonda malign tümörün oluşumu	7
2.5. Tümörün basamaklar halinde kan damarları yoluyla yayılması	9
2.6. Kanser, genetik değişikliklerin birikmesinden ortaya çıkması	10
2.7. Kanserin genetik oluşumu ve kanserin invaze olması	11
2.8. Kanserin başlaması	12
2.9. Aşırı hücre bölünmesine ve kansere yardımcı olan onkogenin protoonkogenden dönüşümü	13
2.10. Heterozigosite kaybının şematik olarak gösterimi	15
2.11. Kolonun büyük bağırsaktan oluştuğunu göstermektedir	17
2.12. Kolonun bölümleri	18
2.13. Kolonda ortaya çıkan polipler (a,b) ve polip oluşum evreleri	20
2.14. Kolon kanser çeşitlerinin oranları	23
2.15. WNT sinyal yolu	25
2.16. HNPCC de kusurlu mismatch tamir enzimlerinin kalıtımı ve olgularda (hastalarda) yüksek oranda genetik mutasyonların birikimi	27
2.17. HNPCC de görülen tümör sıklığı ve bölgesi	28
2.18. Kolon kanserinde anöploidi	33
2.19. Kolon kanser tümörögenesisi	34
2.20. Kolon kanserin polipli modeli	37
2.21. Hücrenin adenomadan karsinomaya ilerleyişi	39
2.22. Kolon kanserinde belirlenen evreler; a- evre 0, b-evre I	44
2.23. Kolon kanserinde belirlenen evreler; c- evre IIa ve b, d-evre IIIb	45
2.24. Kolon kanserinde belirlenen evreler; e-evre IV	46
2.25. İnsan TP53 yapısı ve lokalize gen bölgesi	48

<u>Şekil no</u>	<u>Sayfa no</u>
2.26. p53 protein bölgeleri	49
2.27. Mutant p53' ün ve wild tip p53' ün x-ışımına verdiği cevap	50
2.28. p53 ve p21 genlerinin etkileşimi	52
2.29. p53' ün Mdm2 bağımlı bozulması	53
2.30. Normal hücrede hipoksiya durumunda p53'ün aktifleşmesi ve p53' ün mutasyona uğrayan hücrede DNA hasarı	53
2.31. DNA hasarı (ve diğer sinyaller) hücre bölünmesini cd-kinaz inhibitörlerinin ekspresyonunun artışıyla durdurması	58
2.32. p53 gen bölgesindeki mutasyonlar	62
2.33. Alt mukozayı saran invaziv kanser	65
2.34. P53 genine ait ekson bölgeleri	66
2.35. PCR' ın şematik gösterimi	69
2.36. Restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi (RFLP)' nin şematik gösterimi	71
2.37. Restriksiyon parçası uzunluk polimorfizminin jelde görüntüsü	71
3.1. Arg72Pro ve G13964C bölgelerine ait primer optimizasyonu, annealing sıcaklıkları ve MgCl2 konsantrasyonlarını belirlemek üzere Gradientli Thermal Cycler'da (G PCR) kurulan deney düzeneği	79

GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Grafikler no</u>	<u>Sayfa no</u>
2.1. Ülkemizde 1975-2000 yılları arasında erkeklerde kolon kanserinin diğer kanserler arasındaki eğrisi	31
2.2. Ülkemizde 1975-2000 yılları arasında kadınlarda kolon kanserinin diğer kanserler arasındaki eğrisi	31
2.3. Tüm kanserler arasındaki p53 mutasyonunun sıklığı ve kolon kanserin bu kanserler arasındaki yeri	61
2.4. Kolorektal kanserindeki p53 gen mutasyonlarının sıklığı	67
2.5. p53 deki mutasyonların hassas nokta (hot spot) bölgelerdeki sıklığı	67

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo no</u>	<u>Sayfa no</u>
2.1. Tumor supressor genler	12
2.2. FAP 'ın klinik ve molekuler baglantisi ve diger kanser turleri ile olan iliskisi	28
3.1.a. 4 µl MgCl ₂ için kullanılan PCR karışımı.	78
3.1.b 5 µl MgCl ₂ için kullanılan PCR karışımı.	78
3.1.c 6 µl MgCl ₂ için kullanılan PCR karışımı.	78
3.4. Arg72Pro için son optimizasyon PCR miski.	79
3.5. G13964C için son optimizasyon PCR miski.	80
3.6. Arg72Pro ve G13964C için son optimizasyonun PCR şartları.	80
3.7 Arg72Pro için PCR'da kullanılan kimyasallar ve miktarları.	81
3.8 G13964C için PCR'da kullanılan kimyasallar ve miktarları.	81
3.9 Arg72Pro ve G13964C için uygulanan PCR şartları.	81
3.10. Arg72Pro polimorfizmi için enzim kesiminde kullanılan kimyasalların miktarları.	83
3.11. G13964C polimorfizmi için enzim kesiminde kullanılan kimyasalların miktarları.	83
4.1. Olgulara ait laboratuvar çalışma numaraları, olgu yaşı, cinsiyeti, tumor evre bilgileri ve tanısı	84
4.2. DNA izolasyonu ve amplifikasyon sonuçları	85
4.3. Arg72Pro primeri için birinci örnek optimizasyon deneme sonuçları.	88
4.4. G13964C primeri için birinci örnek optimizasyon deneme sonuçları.	88
4.5. Arg72Pro için cinsiyetlerin Arg/Arg homozigot, Arg/Pro heterozigot ve Pro/Pro homozigot genotip yüzdeleri.	93
4.6. G13964C için cinsiyetler arasında GG, GC ve CC genotip yüzdeleri.	94
4.7. Cinsiyetler arasında konulan tanıların yüzdeleri.	95
4.8. Yaş grupları arasında Arg72Pro bölgesi üzerine yüzdeleri.	96

<u>Tablo no</u>	<u>Sayfa no</u>
4.9. G13964C bölgesinin yaş açısından değerlendirilen yüzdeleri.	97
4.10. Yaş aralıklarının çalışılan olgularda tanı yüzdeleri.	98
4.11. Tanıya göre Arg72Pro polimorfizmini veren Arg/Arg homozigot, Arg/Pro heterozigot, Pro/Pro homozigot genotip yüzdeleri.	99
4.12. Tanıların G13964C polimorfizm GG homozigot, GC heterozigot ve CC homozigot yüzdeleri.	100
4.13. Arg72Pro polimorfizmi için frekans değerleri	101
4.14. G13964G polimorfizmi için frekans değerleri	102
4.15. Arg72Pro ve G13964C polimorfizmleri için LOH analizi sonuçları.	102
4.16. Kolon kanserli olguların Arg72Pro bölgesi için klinopatolojik veri ve genetik ilişkisi.	102
4.17. Kolon kanserli olguların G13964C polimorfizm için klinopatolojik veri ve genetik ilişkisi	103

RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim No</u>	<u>Sayfa no</u>
4.1. İlk denenen örneklerde izolasyon sonuçları.	
G6PDHG: Glukoz-6-fosfatdehidrojenaz kontrol.	86
4.2. İkinci grup DNA izolasyonu sonuçları.	87
4.3. Optimizasyon sonuçlarının elektroferezdeki band görüntüsü.	88
4.4. Arg72Pro bölgesinin enzim kesim sonuçlarının jel elektroferezde görüntüleri	90
4.5. G13964C bölgesinin enzim kesim sonuçlarının jel elektroferezde görüntüleri	91

SIMGELER VE KISALTMALAR DIZINI

A:	Adenin
ACF :	Aberrant Crypt Focus
AFAP :	Attenuated Familial Adenomatous Polyposis Coli (Azaltılmış Ailesel Poliposis Koli)
AJCC :	American Joint Committee on Cancer
Apaf-2:	Apoptotic Protease Activating Factor
APC:	Adenomatous Polyposis Coli (Adenomatöz Poliposis Koli)
ATM:	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR:	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein
BAI-1:	Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 1
BL Buffer:	Blood Lysis Buffer (Kan Lizis Tamponu)
Bmi-1:	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1
C:	Sitozin
CDC2:	Cell Division Cycle 2 (Hücre Bölünme Döngüsü 2)
CDK2:	Cyclin-dependent Kinase 2 (Siklin Bağımlı Kinaz 2)
CHK1:	Checkpoint Kinase 1 (Kontrol Nokta Kinazı)
CI :	Chromosomal Instability (Kromozomal Düzensizlik)
CRC :	Colorectal Cancer (Kolorektal Kanser)
DCC:	Deleted in Colorectal Cancer (Kolorektal Kansere Silinmiş)
DMP1:	Dentin Matrix Protein
DNA :	Deoksiribonükleik asit
EDTA :	Etilendiamintetraasetik Asit
FAP :	Familial Adenomatous Polyposis (Ailesel Adenomatöz Poliposis Koli)
G:	Guanin
GADD45:	Growth Arrest and DNA Damage-inducible Protein 45 (Büyümenin Durmasına ve DNA Hasarının Tamirini Yapan Protein 45)
GD-A:	Glioma-derived Angiogenesis Inhibitor
GSK3:	Glikojen Sentaz Kinaz 3

GTBP:	Guanine Thymine Mismatch Binding Proteins
HFAS :	Hereditate Flat Adenomatous Syndrom (Kalıtsal Yassı Adenomatöz Sendromu)
HLH1:	Hemophagocytic lymphohistiocytosis
HMG-1:	High Mobility Group Protein 1 (Yüksek Değişkenli Grup Proteini 1)
HNPCC :	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Kalıtsal Polipsis Kolorektal Kanseri)
kD:	Kilodalton
K-ras:	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LOH :	Loss of Heterozygosity (Heterozigosite Kaybı)
LRP6:	Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (Düşük Yoğunlukta Lipoprotein Reseptörüyle İlişkili Protein)
Map4:	Microtubule-associated Protein 4 (Mikrotübülle İlişkili Protein)
MASPIN:	Murray Serine Proteinase Inhibitor
MDM2:	Mouse Double Minute 2
MLH2:	MutL Homolog 1
MMR:	Mismatch Repair Genes (Uyumsuz Genlerin Tamiri)
MSH2:	MutS Homolog
MSI :	Microsatellite Instability (Mikrosatellit Düzensizlik)
mRNA:	Messenger RNA (Haberçi RNA)
myc:	Myelocytomatosis Oncogene
NER :	Nucleotide Excision Repair (Nükleotit Kesip Çıkarma)
PCNA :	Proliferating Cell Nuclear Antigen (Proliferasyon Gösteren Hücre Antijeni)
PCR :	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PML:	Promyelocytic Leukemia
PMS1:	Postmeiotic Segregation Increased 1 (Mayoz Sonrası Ayrım Artışı1)
PMS2:	Postmeiotic Segregation Increased 2 (Mayoz Sonrası Ayrım Artışı2)
RER :	Replication Error (Replikasyon Hatası)
RNA:	Ribonükleik asit
SCF:	Supercoiling Factor

TAE :	Tris –Asetik Asit-EDTA
TBX2:	T-box 2
TCF:	Turtle Conversation Fund
TGFIIR:	Insulin-like Growth Factor II Receptor
TGFβIIR:	Transforming Growth Factor Beta II
TIL :	Tumour Infiltrating Lymphocytes (Tümör Lenfositlerin Süzülmesi)
TL Buffer:	Tissue Lysis Buffer (Doku Lizis Tamponu)
TSP1:	Tumor Supressor Region 1 (Tümör Süpressör Bölgesi 1)
UCAN :	Ülseratif Colitis İlişkili Neoplazi
WRN:	Werner’s Sendrom Proteini

2. GİRİŞ

Kolorektal kanserler, dünyada en sık görülen malignansilerden biridir (Deveci et al.2004). Kolorektal kanser vakalarının sadece küçük bir oranı (% 5-10) ailesel kanser sendromuna katkıda bulunmakta ve çoğunun sporadik olarak oluştuğu görülmektedir (Smith et al. 2002).

Kolorektal kanser gelişimi birçok faktörle ilişkili olduğu bilinen multistep (çok basamaklı) bir süreçtir (Yamada et al. 2001). Bu tip kanserlerin gelişiminde tümör baskılayıcı genler, onkogenler, DNA tamir genleri rol almaktadır (Deveci et al.2004). Birikmiş olan genetik değişimleri Ki-ras gibi proto-onkogenler ve APC, DCC ve TP53 içeren tümör süpressör genler etkileyebilir (Chang et al. 2005).

p53 insan kanserlerini etkileyen en yaygın tumor süpressör genidir (Yeatman 2003). Kolorektal kanserin ilerlemesinde *p53* mutasyonlarının rolü hakkında şüphe yoktur (Houlston 2001). Kolorektal kanserin gelişiminin ilerleyen evrelerinde, sıklıkla *p53* mutasyonlarını gösteren bu kanserlerin çoğunluğu adenokarsinomlardır (Ward et al. 2001).

p53 proteini DNA'nın yapısını korumada önemlidir. DNA hasarı, hücre siklusunun G1 fazında *p53* aracılığıyla durdurmasıyla sonuçlanır ve bunu tamir izler, eğer tamir başarılı ise *p53* apoptosisi indükler. Dolayısıyla mutasyon veya delesyonla *p53* fonksiyonunun kaybı hücrede genom boyunca mutasyonların birikimini izler ve kromozomal instabilite, hücre siklusunun G1'de durdurularak bozulmasıyla sonuçlanır ve apoptosise (programlanmış hücre ölümü) yönlendirir (Houlston 2001).

En önemli *p53* polimorfizmlerden 72. kodonda yer alan prolin (72Pro: CCC) ve arjinini (72Arg:CGC) kodlayan 72. kodon 4.eksonda gözlenen restriksiyon parça uzunluk polimorfizmidir (Stock et al. 2004). Kolorektal ve meme karsinomlarını içeren birçok kanser hastalığında sonuçlar şüpheli kalmasına rağmen, kodon 72

polimorfizmi ve kanser riski arasındaki anlamlı ilişki rapor edilmiştir (Langerød et al. 2002).

Son zamanda yapılan çalışmalar, *p53* geninin 72. kodonundaki polimorfizmin yaygın olduğunu göstermiştir. Biyolojik ve biyokimyasal olarak farklılık iki allele arjinin (Arg) ve prolin (Pro) izoformlarında sonuçlanmaktadır (Pérez et al. 2006).

İntronik varyantlar, DNA-protein önemli etkileşiminin bozulması yoluyla veya tipik olmayan eklemeler yoluyla gen düzenlemesini etkileyebilirler (Marsh et al. 2001). Son zamanlarda, *p53*'ün 13964 nükleotitdeki intronik C'in G'e baz değişimini rapor edilmiştir (Buller et al.2005). *p53* geninde G13964C yerine, tekrar ekleme bölgesi yoktur ve dolayısıyla *p53* ekspresyonunu etkilediğine dair doğrudan bir kanıt yoktur (Buyru et al. 2005).

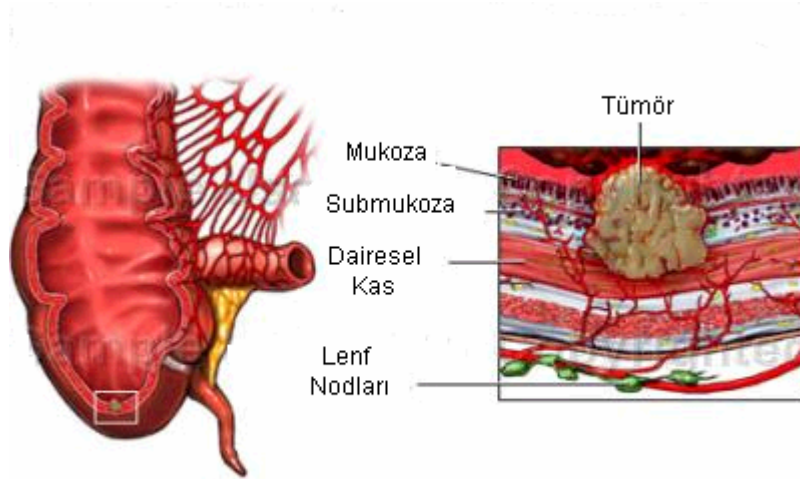
Çalışmamızda kolon kanseri tanısı konmuş olgulara ait parafine gömülü tümör doku örnekleri kullanıldı. Bu doku örneklerinden DNA izole edilerek, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemiyle, hedef eksonlar amplifiye edildi. Literatürlere dayanarak belirlenen 72. kodonda (ekson 4)'de yer alan Arg72Pro bölgesinde ve 6. introndaki G13964C baz değişimi bölgesinde *p53* mutasyonlarının olup olmadığının tespiti için enzim kesimi yapıldı. Kesim işleminde Arg72Pro bölgesi için BstFNI enzimi, G13964C bölgesi için BstHHI enzimi kullanıldı.

Bu araştırmada özel bir patoloji laboratuvarının arşivlerinde bulunan, tanısı konmuş kolon kanserli olgulardan elde edilen parafin bloklara gömülü doku örnekleri kullanılmıştır. Tez çalışmamız içerisinde bu örneklerle ait veriler tablolar halinde sunulmuştur. *p53* geni mutasyonunu belirleyebilmek için Arg72Pro ve G13964C polimorfizmlerinin saptanması amaçlanmıştır.

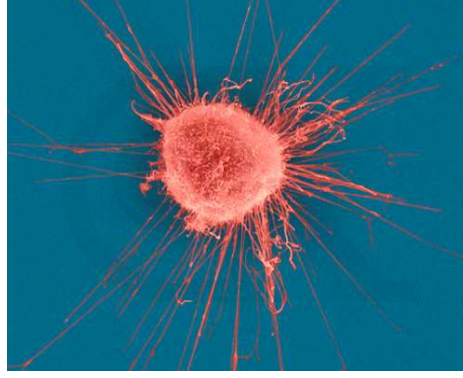
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kolon Kanseri Biyolojisi

Kanser tek bir hastalık olmayıp, daha çok bir kitle ya da tümör oluşumuna yol açtığını bildiğimiz kontrolsüz hücre proliferasyonu (çoğalması) karakterize edilmiş olan neoplazinin (patolojik anlamda yeni doku oluşumu) daha kesin formlarını tanımlamak için kullanılır. Bununla birlikte neoplazinin kanser olabilmesi için malign (habis, kötü huylu) özellik göstermesi, bir başka deyişle kontrolsüz büyümesi, komşu dokuları istila edebilmesi veya yakın-uzak mesafelere yayılabilme (metastaz; herhangi bir organdaki kanser hücrelerinin vücudun başka bir bölümüne atlaması) özelliğine sahip olması gerekmektedir (Tümörler metastaz yapmıyorlarsa kanseröz değildir ve bu durumda, benign -iyi huylu- tümör olarak adlandırılır.) (Nussbaum et al. 2005). Tümör, normal dokuların gelişmesini aşan, normal dokulara uyum göstermeyen ve kendisini oluşturan uyarının yok olması durumunda bile büyümeye devam eden anormal doku kitlesidir (Şekil 2.1). Kanser terimi ise, tüm kötü huylu tümörleri kapsayan bir deyimdir (Canda 1982) (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. Mukoza, submukoza, hücresel kası ve lenf nodlarını saran tumor dokusu (internet 1).



Şekil 2.2. Kanser hücresi (internet 2).

Tümörler, biyolojik davranışlara göre benign, malign ve ikisi arasında yer alan intermediyer olmak üzere üçe ayrılır. İntermediyer olanların nasıl bir klinik gidiş göstereceğini belirlemek güçtür. Bazen iyi huylu tümörlerde, yerleşim bölgelerine bağlı olarak kötü bir klinik gidiş gösterebilirler (Cotran, 1989).

Tümör adlandırılmasında en çok kullanılan yöntem *histolojik* ya da *sitolojik sınıflama*dır ve doku ya da hücre adının sonuna kimi eklerin bağlanması ile yapılır. *Om* ya da *-oma* eki benign tümörleri simgeler. Malign tümörler için bu ek, tümör epitel kökenli ise *karsinom*, bağ ve destek dokusu kökenli ise *sarkom*dur. Örneğin, fibröz dokunun benign tümörü *fibrom*, malign tümörü *fibrosarkom*, değişici epitelin (transizyonel) benign tümörü *transizyonel hücreli papillom*, malign tümörü *transizyonel hücreli karsinom*dur. Tümör adlandırılmasında kullanılan *blastom* ya da *blastoma* eki ise tümörün embriyonel hücreleri taklit ettiğini belirtir. Bu eki alan tümörler genellikle çocukluk çağında gözlenen malign tümörlerdir. Örneğin, retinadan orjin alan retinoblastoma, böbrekten orjin alan nefroblastoma gibi (Kazancıgil, 1982).

2.2 Benign ve Malign Tümörlerin Özellikleri

Benign ve malign tümörler arasındaki farklılıklar olarak 4 ana grupta toplanabilir (Şekil 2.3, 2.4).

2.2.1 Farklılaşma ve Anaplazi

Farklılaşma, tümörün kökenini aldığı normal hücelere yapısal ve fonksiyonel olarak benzerliğini anlatır. Genel olarak bütün benign tümörler iyi differansiyedir. Malign tümörler ise iyi diferansiye formdan hiç diferansiyasyon göstermemeye (anaplazi) kadar değişen geniş bir spektrum içerisinde bulunurlar (Lever 1975).

Farklılaşma yokluğunda, tümör hücrelerinde belirgin morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler vardır. Hücreler ve çekirdekleri şekil, hacim ve boyanma özellikleri bakımından birbirlerinden ve köken aldığı hücrelerden önemli ayrıcalıklar gösterir. Çekirdekleri büyüktür, koyu renk boyanır ve genellikle büyük nukleoluslar (çekirdekcik) içerir (Walter, 1974) .

Tümörlerde farklılaşma kötüleştikçe genel olarak mitoz sayısı artar ve normalden farklı mitoz şekilleri ortaya çıkar. Tümörlerde, özellikle hızlı bir büyüme gösteren malign türlerinde, kanlanma gereksinimi büyüme hızına paralel olarak sağlanamadığından nekroz (doku ölümü) alanları görülür (Yenerman, 1980).

Neoplastik hücrelerin fonksiyonel farklılaşmaları doğaldır ki yapısal diferansiyasyonu ile paralellik gösterir. Endokrin organların benign tümörleri ve iyi differansiye karsinomları kökenleri ile uyumlu hormonları yaparlar. Bazen endokrin dışı organ tümörlerinin de hormon ya da benzeri salgıları olabilmektedir (Kazancıgil, 1982).

2.2.2 Büyüme Hızı

Benign tümörler genellikle yavaş büyür, malign tümörler ise hızlı büyür ve zamanla yayılarak hastayı ölüme götürür. Özellikle hormona bağımlı benign tümörlerin büyümesi bir süre sonra durabilir, hatta küçülebilirler. Örneğin, uterus düz kasının benign tümörü (leiomyoma uteri) menopoz sonrası küçülebilir. Çok

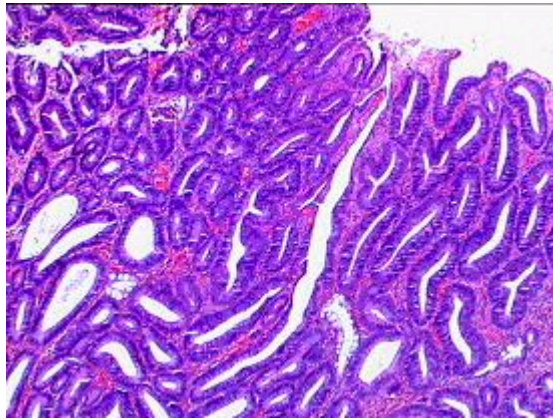
nadir de olsa kanserlerin de küçüldüğü, hatta aniden kaybolduğu görülmüştür (Canda, 1982).

2.2.3 İnvazyon

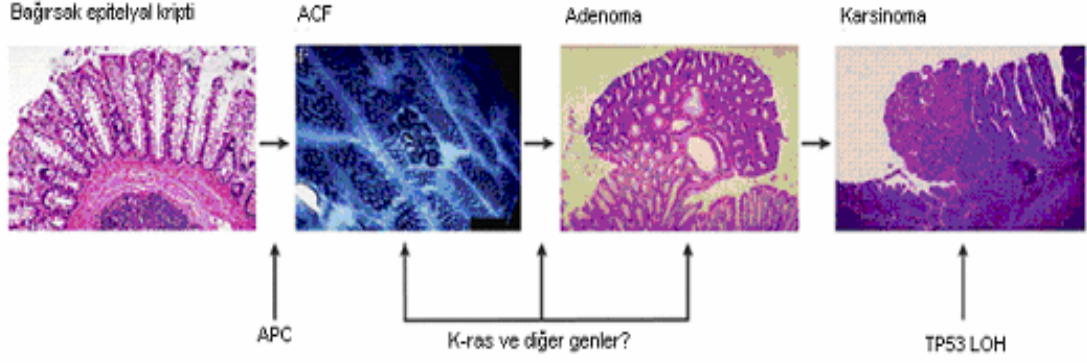
Malign tümörlerin komşu dokuya yayılması olayıdır. Benign tümörler kitlesini genişleterek büyürler ve genellikle kapsülleri vardır. Malign tümörler ise büyürlerken çevre dokuların içerisine ilerler ve onları harab ederek yerlerini alırlar. Bu nedenle çevre doku ile sınırları net değildir. Preinvaziv dönemde tesbit edilen kanserlere *karsinoma in situ* denir. Kanser henüz örtü epiteli içersinde olup bazal membranı geçmemiştir (Yenerman, 1980).

2.2.4 Metastaz

Metastaz, kanserin birincil (primer) odakla aralarında bir devamlılık olmaksızın vücudun başka doku ve organlarına yayılması olayıdır. İnvazyon kabiliyeti olan kanser hücreleri kan ve lenf damarlarına veya vücut boşluklarına girerek vücudun başka organ ve dokularına yayılır ve oralarda yeni tümör odakları oluşturur. Genel olarak büyük, kötü diferansiye ve hızlı büyüyen malign tümörlerin metastaz yapma kabiliyetleri yüksektir (Cotran,1989).



Şekil 2.3. Kolonun benign adenomatos polipleri (internet 3).



Şekil 2.4. Kolonda malign tümörün oluşumu (internet 4).

2.3 Metastaz Yolları

Kanserler başlıca; vücut boşlukları ve yüzeyleri, lenf damarları, kan damarları yoluyla yayılırlar.

2.3.1 Vücut Boşlukları ve Yüzeyleri Yoluyla Yayılma

Malın neoplazmın vücut boşluklarını çevreleyen yüzeylere ulaşması ile, tümörden kopan hücreler tohum rolü görerek o vücut boşluğuna komşu diğer doku ve organlara yayılabilir. Bu yolla yayılma en sık peritoneal boşlukta (karın boşluğu) ve özellikle over kaynaklı kanserlerde görülür (Lever, 1975).

2.3.2 Lenf Damarları Yoluyla Yayılma

Karsinomların yayılması genellikle bu yolla olmaktadır. Sarkomlar nadiren lenfatiklerle yayılır. Ancak lenf damarları ve kan damarları arasında pek çok bağlantılar olduğu için, lenf yoluyla yayılma sırasında kan yoluyla yayılma da söz konusu olabilir (Walter, 1974).

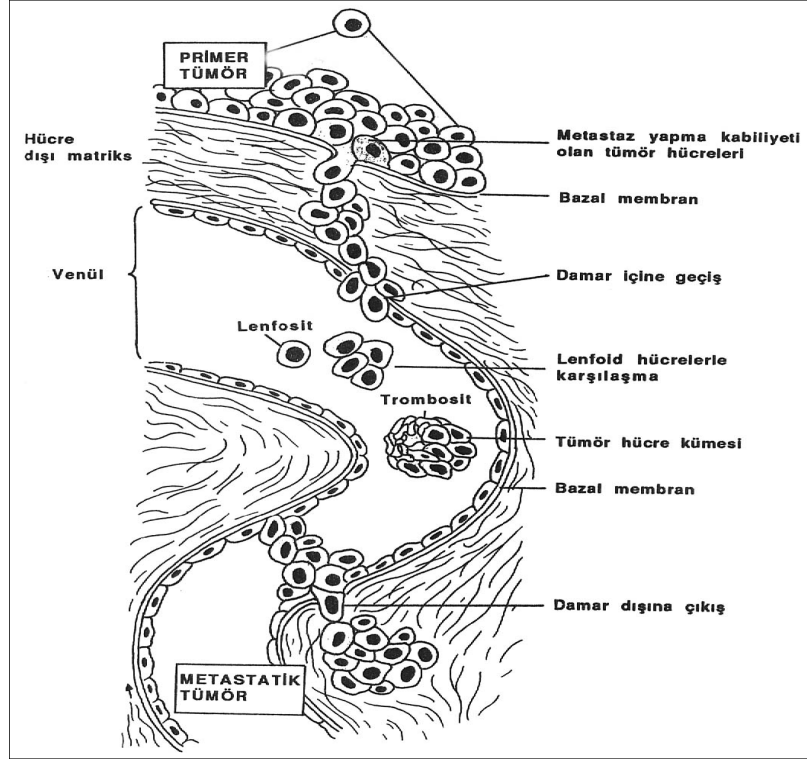
Lenf yollarına giren kanser hücreleri bölgesel lenf düğümlerine ulaşır ve burada tutularak kanserin yayılmasına bir süre engel oluşturulur. Ancak

lenf düğümü kanser hücreleri ile dolduğunda veya lenf düğümüne erişen kanser hücrelerinin burada yerleşip büyümelerinden bir müddet sonra diğer lenf düğümlerine yayılma olabilir. Malign tümörün bulunduğu doku ya da organa ait bölgesel lenf düğümlerinde büyüme saptanması, her zaman metastaz varlığı anlamına gelmez. Zira tümör hücre artıkları veya tümör antijenleri reaktif tabiatta bir büyümeye neden olabilir (Kazancıgil, 1982).

2.3.3 Kan Damarları Yoluyla Yayılma

Sarkomlar (bağ ve destek dokulu) daha çok bu yolla yayılırlar. Ancak, karsinomlar da bu yolu kullanabilirler. Özellikle venöz damarların çeperi kanser hücreleri tarafından kolayca invaze edilebilir ve koparak kan akımına giren kanser hücreleri başka organ ve dokulara yayılabilir (Şekil 2.5). Ayrıca sonuçta venöz dolaşıma katılan lenf akımı nedeniyle de, lenf yollarına giren tümör hücreleri kan akımına karışabilir. Arter duvarları ise tümör invazyonuna oldukça dirençlidir (Canda, 1982).

Kan dolaşımı yoluyla metastazlar en sık karaciğer ve akciğerde görülür. Vücutta geniş bir yer tutan iskelet kaslarına metastaz oluşumu nadirdir. Bunun sebebi tam olarak bilinmemektedir. Tümör dokusunda küçük kan damarlarının tümör hücreleri ile invaze edilmiş olması her zaman metastazın varolduğu anlamına gelmez (Lever, 1975).



Şekil 2.5. Tümörün basamaklar halinde kan damarları yoluyla yayılması (Cotran, 1989).

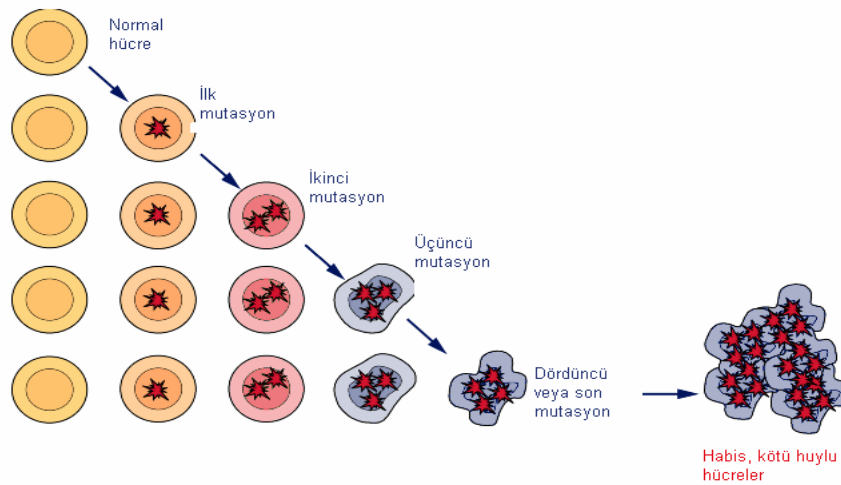
2.4 Kanserin Genetik Yapısı

Kanserin genetik ile bağlantılı olabileceği düşüncesi ilk kez 20.yüzyılın başlarında ortaya atıldı ve bu fikir kanser araştırmalarının kaynağı olarak rol oynadı (Öner, 2003).

Hücre bölünmesi ve hücre ölümünü kontrol eden çok çeşitli genler bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan yoğun araştırmalar hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü kontrol eden genlerin mutasyonlarının kanserden sorumlu olduğunu göstermiştir. Birçok kanserde, mutasyonlar tek bir somatik hücrede oluşur ve daha sonra bölünerek kanser gelişimine yol açarlar (Nussbaum, 2005). Mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi tüm kanserlerin ortak özelliği olarak kabul edilmektedir. Kanser çeşitlerinin çoğunda mutasyonlar somatik hücrelerde meydana gelir ve bu mutasyonlar üreme hücreleriyle gelecek nesillere aktarılamaz. Ancak, kanser vakalarının %1 de, eşey-kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılır ve bu değişim, yeni neslin

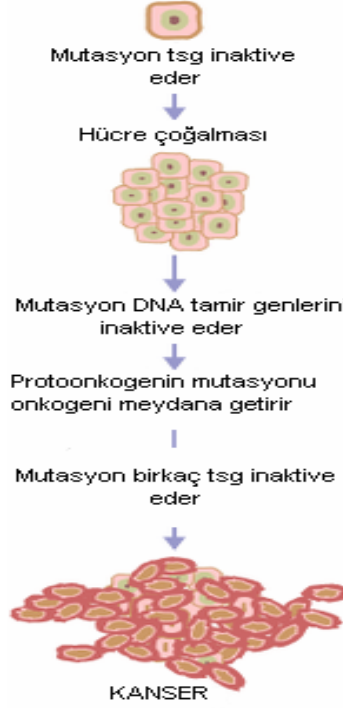
kansere yatkınlığını oluşturur. Her ne kadar bu tip vakaların sıklığı düşükse de, bu tip mutasyonlarla yapılan çalışmalar kanserin kökeninin anlaşılmasına büyük katkı sağlamıştır. Bazen, kalıtsal mutasyonlar kanser oluşumunda tek başına yetersiz kalır. Kanser oluşumunun tamamlanması ve homozigot genlerin oluşması için, homolog lokuslarda somatik mutasyonlar gerekir. Hangi durumda olursa olsun, kanser hücre seviyesinde genetik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir (Öner, 2003).

Daha nadir tipi ise herediter (kalıtsal) kanser sendromunda izlenmekte, kanserin başlamasına neden olan mutasyonlar germ hücrelerine aktarılmakta ve böylece vücudun tüm hücrelerinde yer almaktadır. Mekanizması ne olursa olsun kanser bir kez başladığında, sitogenetik yapının korunmasından ve DNA'da oluşabilecek hasarı tamirden sorumlu hücresel mekanizmaları kodlayan genlerdeki mutasyonlar kümülatif olarak bir artış göstererek kanseri yaygınlaştırır. Neoplastik hücrelerin orijinal klonu, her biri birbirinden farklı bir grup mutasyon taşıyan ancak birbirleri ile üst üste çakışan mutasyonlar şeklinde malignensinin çeşitli derecelerinin alt grupları içerisinde gelişebilir. Tüm bu olaylar zinciri, en iyi şekilde kolon kanserinde gösterilmesine karşın diğer kanser türlerinin hepsinde olmasa da bazılarında yer almakta ve şematik olarak Şekil 2.6'de gösterilmektedir (Nussbaum, 2005).



Şekil 2.6. Kanser, genetik değişikliklerin birikmesinden ortaya çıkması (internet 5).

Kansere neden olan genler, iki temel alt gruba ayrılmaktadır: onkogenler ve tümör supressör genler (Şekil 2.7).



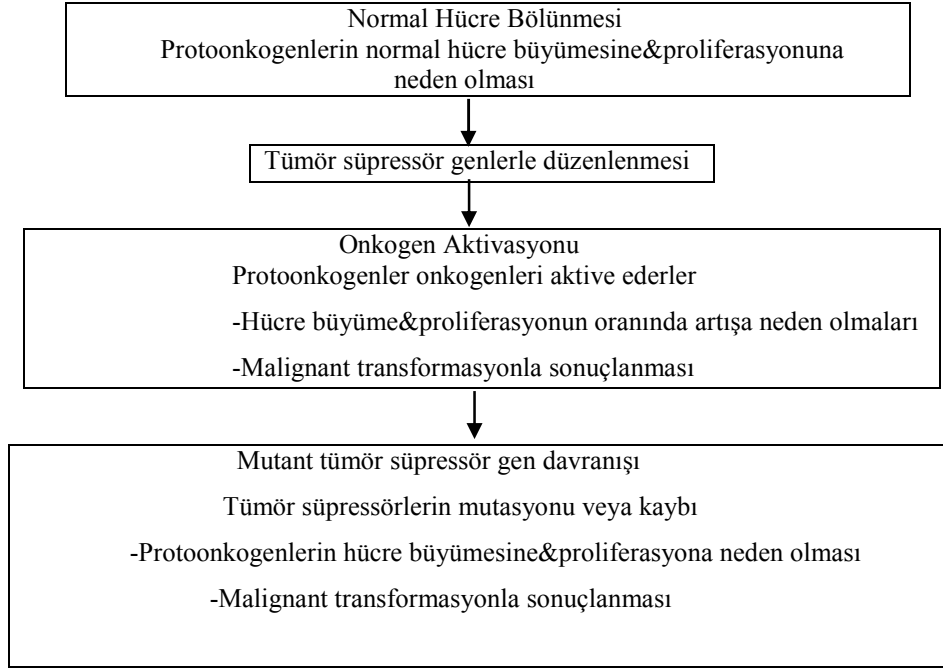
Şekil 2.7. Kanserin genetik oluşumu ve kanserin invaze olması (tsg; tümör süpressör gen) (internet 6).

2.4.1 Onkogenler

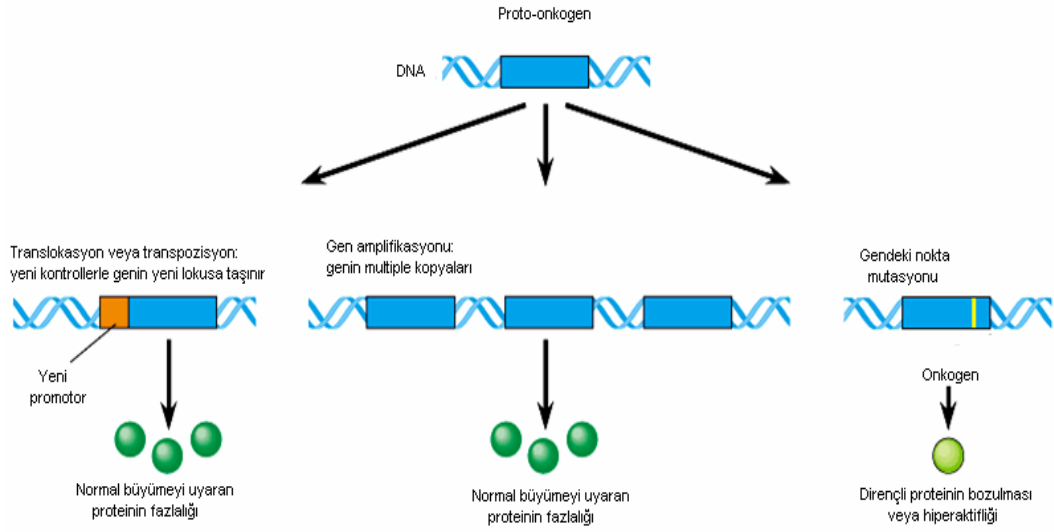
Onkogenler, çoğunlukla proto-onkogen adını verdiğimiz normal hücresel genlerin mutant (aktif olan) allelleri olmakla birlikte telomerazları kodlayan veya apoptozisi (programlı hücre ölümü) bloke eden genler de olabilirler. Onkogenler genellikle fonksiyon kazandıran mutasyon özelliğine sahip olup, proliferasyonu stimüle etme, tümörün kanlanması artırma ve apoptozu engelleme gibi mekanizmalarla malign transformasyonu gerçekleştirmektedir (Nussbaum, 2005).

Normal hücre siklusunda, onkogenler artan büyüme hareketini, tümör supressör genlerin büyümeyi inhibe etmesiyle dengeler (Şekil 2.8). Protoonkogenlerin genetik aberasyonları, tümör hücrelerinin büyümesini artıran onkogenlerde

sonuçlanır (Rupnarain et al. 2004) (Şekil 2.9). Onkogenler, intraselüler yolun bir kısmında olduğu gibi hücre büyümesini inhibe ederler. Böyle yollar eksternal büyüme sinyallerine yanıt verir ve sinyali nukleusa çok basamaklı adımlarla transfer eder (Hendon ve DiPalama et al.2005).



Şekil 2.8. Kanserin başlaması (Rupnarain et al. 2004)



Şekil 2.9. Aşırı hücre bölünmesine ve kansere yardımcı olan onkogenin protoonkogenden dönüşümü (internet 7).

Onkogenin sadece bir alleli disfonksiyona sebep olmak için mutant olmaya ihtiyaç duyar (Hendon ve Dipalama 2005). Mutasyonlar, supressör genleri disfonksiyonel (bozuk veya anormal fonksiyon) hale getirir, bu yüzden tümör serbestçe büyür (Rupnarain et al. 2004). Bu durum gerçekleştiğinde, eksternal (dışta ve yüzeyde kalan olaylar) uyarıya yanıtta ve düzenlemektense, büyüme sinyali yapıcı veya devamlıdır (Hendon ve Dipalama et al. 2005).

2.4.2 Tümör Supressör Genler

Tümör supressör genler adlarından da anlaşılacağı gibi hücre büyümesini düzenleyerek tümör gelişimini engelleyen genlerdir. Tümör supressör genler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyon kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine, anormal hücre büyümesine ve defektif apoptozise neden olmaktadır (Nussbaum, 2005).

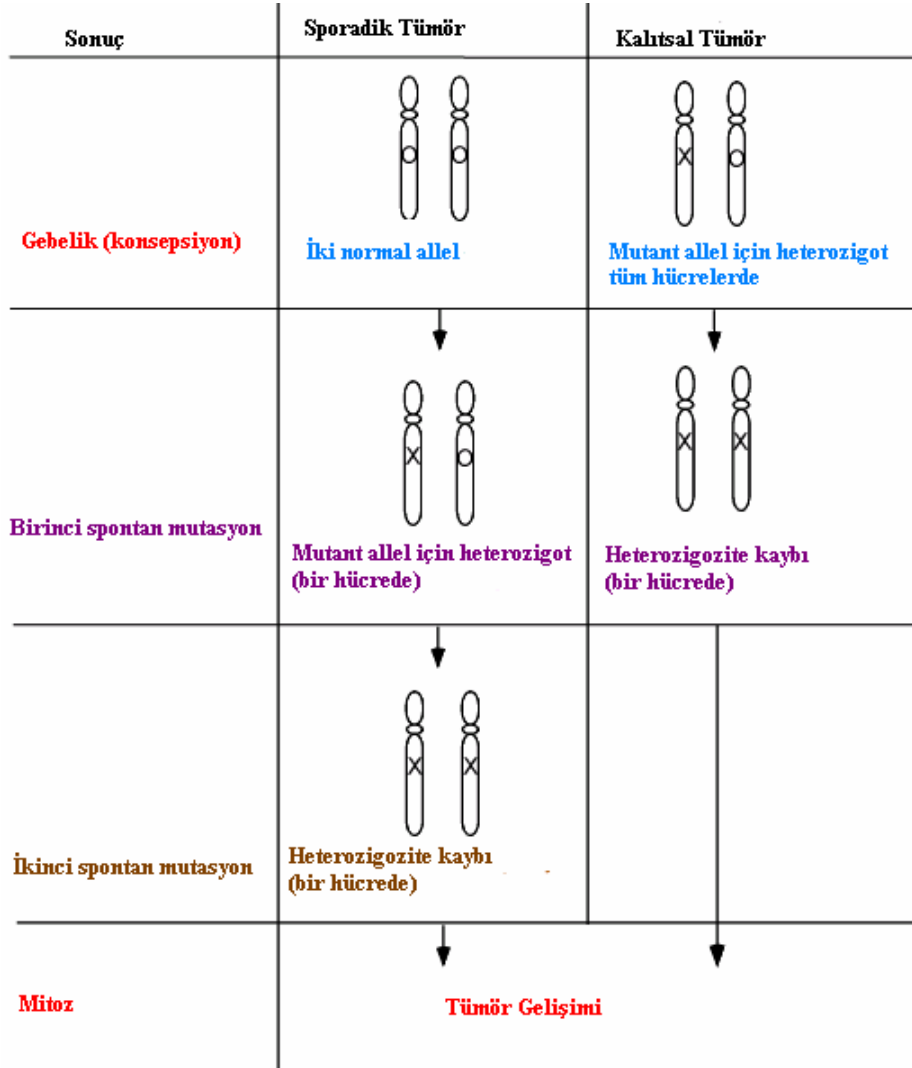
Tümör supressör genler (Tablo 2.1), hücre büyümesini kontrol eder veya baskılar. Bu fonksiyonu mutasyon yoluyla kaybettiğinde hücre büyümesi kontrol edilemez. Genin tamamen kaybı ya da hasar görmesi için her iki allelde tümör

supressör gene ihtiyaç duyar, böylece hasar veya kayıp birkaç yolla oluşur (Rupnarain et al.. 2004).

Tablo 2.1. Tümör supressör genler (Gao ve Honn 1995).

Gen	Lokusu	Hüresel yeri	Hareketi	Organ veya doku orjinleri veya tümör
RB	13q14	nukleus	Hücre siklusunu ve gen aktivitesini düzenler	Göz, kemik,meme, akciğer, özafagus, prostat, mesane, böbrek,seviks
P53	17p13.1	nukleus	Hücre siklusunu ve gen aktivitesini düzenler	Meme, kolon , mesane, yumurtalık, beyin, testis, yumuşak doku, böbrek, deri, kani akciğer, pankreas, mide, özafagus, karaciğer, prostat
DCC	18q21.3	Hücre membranı	Hücre adhezyonu ve sinyal transdüksiyonu	Kolon , mide, ağız, özafagus, uterin, kan, testis, prostat, pankreas
APC	5q21	sitosol	Mikrotübül topluluğunu yönetir	Kolon , akciğermide, özafagus, ağız, meme, yumurtalık, prostat
MCC	5q21	sitosol	bilinmiyor	Kolon , akciğer, mide, meme, özafagus, yumurtalık, prostat
WT-1	11p13	nukleus	Gen aktivitesini düzenler	Böbrek, mesane, göz, yumuşak doku, akciğer, yumurtalık
NF-1	17q11	CM-ilişkili	P21(ras) sinyal yolunu düzenler	Sinir, kemik, deri
NF-2	22q12	CM-ilişkili	bilinmiyor	Sinir, kolon , meme,deri
VHL	3p25	CM-ilişkili	bilinmiyor	CNS, göz, böbrek, akciğer, meme, yumurtalık, deri, yumuşak doku
MST1	9p21-22	nukleus	CDK inhibe eder ve hücre siklusunu düzenler	Deri, özafagus, pankreas, burun, akciğer, mesane, böbrek, beyin, kan, yumuşak doku
BRCA1	17q21	nukleus	Transkripsiyon faktörü?	Meme, yumurtalık, prostat

FAP (familial adenomatous polyposis-ailesel adenomatoz poliposis) da olduğu gibi, ilk allel mutant formda kalıtılabilir veya sporadik kolon kanserinde olduğu gibi somatik olarak mutant olabilir. Eğer ikinci allel, somatik mutasyona ihtiyaç duyarsa, gen fonksiyonunu kaybeder. İkinci allelin kaybı için yaygın mekanizma heterozigosite kaybı (LOH-Loss of Heterozygosity) olarak adlandırılır (Şekil 2.10). Nasıl oluştuğu tam olarak anlaşılmasına rağmen, tümör genlerinin önemli bir mekanizmasıdır. LOH'la beraber, kromozomal materyallerin asimetrik yayılması, izleyen mitoz esnasında gözlenir. Bu durum normal allelin kaybıyla sonuçlanabilir, genlerin normal fonksiyonu mutant tümör supressör genlerde ortaya çıkar (Rupnarain et al. 2004). *p53* gen lokusu heterozigosite kaybını gösteren en yaygın bölgedir (Hardy et al. 2000).



Şekil 2.10. Heterozigosite kaybının şematik olarak gösterimi (internet 8).

Hücrede heterozigosite kaybı (LOH) hücre genomunun tek ebeveynin kalıtılan bölümünde kaybını gösterir. Kanserde en yaygın olay, kaybolan bölgede sıklıkla tümör süpressör genin varlığını işaret eder. Tümör süpressör genin kalan kopyası nokta mutasyonu ile inaktive edilecektir. Kabul edilen bir örnek, kalıtsal retinoblastomadır, kalıtılan tek ebeveynin tümör süpressör Rb1 (retinoblastoma) kusurludur. Birçok hücrede fonksiyonel ikinci kopya olmasına rağmen çocuklarda bu retinal kanserin gelişimine neden olan değişmeyen tek hücredeki olaylarda heterozigosite kaybı tesadüfidir (Alfred and Knudson 1971)

Heterozigosite kaybı iki methodla ortaya çıkabilir. İlki, kromozom bölgesinin delesyonudur, sadece bir kopyanın kalmasıyla sonuçlanır. İkincisi, genetik rekombinasyon hücrede kromozomal bölgeden ayrılır, fakat ikisinde aynı aileden gelir (Forsslund et al. 2002).

Kanserlerde heterozigosite kaybı, organizmanın germline DNA'sındaki genetik lokusunda heterozigosite varlığı delillerle veya heterozigosite eksikliği tanımlanabilir. Bu sıklıkla iki ebeveynde kalıtılan farklı alleller için mikrosatellitler veya tek nükleotit polimorfizmleri gibi polimorfik markerlar kullanılarak yapılır (Forsslund et al. 2002).

2.4.3 DNA Tamir Genleri (DNA Mismatch Repair Genes)

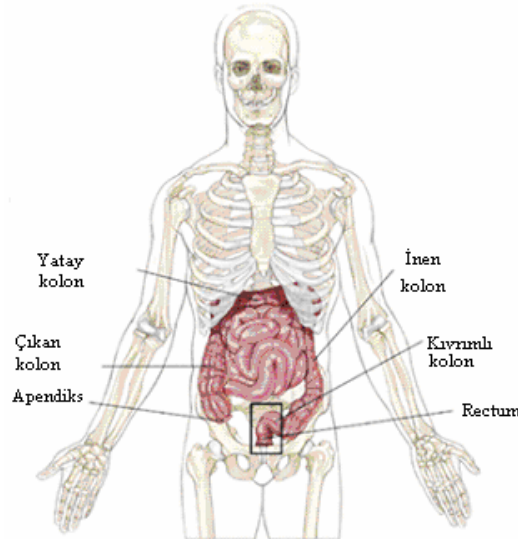
Son zamanlarda, tümör süpressör gen kategorisi yeni bir gen sınıfını kapsamakta olup bu genler, MMR (Mismatch Repair)-DNA tamir genleri olarak adlandırılmaktadır. Bu büyük gen ailesi, mutajenik kimyasalların ve ışın gibi ajanların sebep olduğu DNA hasarını tamirden ve hücredeki genomik yapının korunmasından sorumludur (Wyllie, 1997). DNA tamir genlerinin fonksiyonu, mutasyonel hasar veya DNA replikasyonun her ikisinde oluşan DNA hataları ile bağlantılıdır. Hata tamir edilemezse, bu genler apoptosisi indükler veya DNA hasarını tamir eder. DNA tamir genlerinin disfonksiyonu, kardeş hücrede mutasyonların birikmesine neden olur (Hendon ve DiPalma 2005).

DNA tamir genlerinin fonksiyonel etkilerinin inaktivasyonu doğrudan değildir, bu genler *tümör supressör* olarak sınıflandırılır, çünkü fonksiyonlarının kaybı, kanser artışında önemli etki yapmaktadır. DNA tamir fonksiyon kaybına örnek, kolon ve meme kanserlerinin araştırılmasından elde edilmiştir. HNPCC (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer-Kalıtsal Polipsiz Kolorektal Kanser), mismatch tamir genlerinden birinin, iki allelinden biri DNA'da mutasyondur (Warren 1997).

Germline mutasyonların (*MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2*, mismatch tamir genleri veya mutator genleri olarak da bilinir) keşfinden önce, HNPCC'nin teşhisi sadece klinik bulguların dökümente edilmesi üzerine yapılmıştır ve sıklıkla pedigree genişletilmiştir (Lynch ve Chapelle et al. 2005).

2.5 Kolon Kanseri

Küçük bağırsak büyük bağırsağa, sağ alt karın bölgesinden bağlanır. Kalın bağırsağın ilk ve en uzun bölümü kolondur (Şekil 2.11). Kolon yaklaşık beş cm kalınlığında veya çapında kaslı tüptür. Kolonda, besin maddelerinden su ve mineral maddeler absorbe edilir (Ward et al. 2005).



Şekil 2.11. Kolonun büyük bağırsaktan oluştuğunu göstermektedir (internet 9).

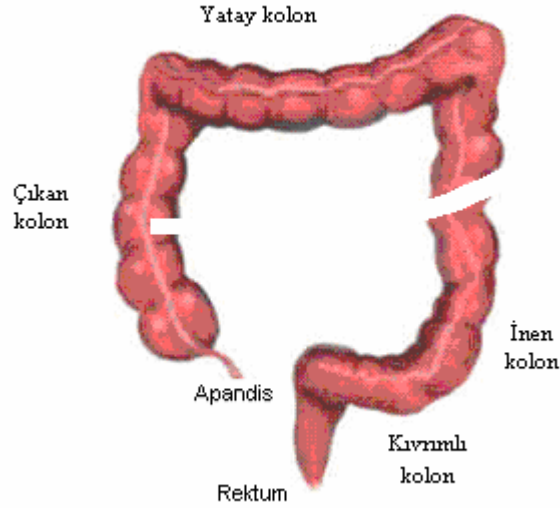
Kolon dört bölüme sahiptir;

a-İlk bölüm *ascending (çıkan) kolon* olarak adlandırılır. Kolona küçük bağırsağın eklendiği yerden başlar ve kişinin üst sağ karın bölgesine kadar uzanır.

b-İkinci bölüm, vücudu sağdan sola doğru geçen bölüme kadar olan yere *transverse (yatay) kolon* adı verilir.

c-Üçüncü bölüm *descending (inen) kolon* adı verilir, sol tarafın altına kadar uzanır.

d-Dördüncü bölüm, S biçiminden dolayı *sigmoid (kıvrımlı)* olarak bilinir (Ward 2005) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Kolonun bölümleri (internet 10)

Büyük bağırsakta bir kanser formu, kolon veya rektum duvarının içine ve astarlanma yoluyla gelişmeye başlayabilir. Hücresel sıvı ve atıkları taşıyan kanallar olan lenf damarları veya kan damarlarında gelişebilen kanserler duvarları istila ederler. Kanser hücreleri, enfeksiyonlarla mücadeleye yardım eden bean (baş veya bezelye tanesi gibi) biçimli yapılar olan lenf nodları yakınına süzülürler. Kanser hücreleri metastaz olarak adlandırılan bu süreçle, kan veya lenfatik damarlar yoluyla vücudun uzak bölümlerine taşınırlar (Ward, 2005).

Kolon kanseri genellikle uzun yıllar boyunca yavaş yavaş ilerler. Kanser gelişiminden önce, kansere dönüşen nonkanserojen polipler gelişir. Polip, kolon veya rektum hattında dokunun büyümesidir (Şekil 2.12) (Ward, 2005).

2.5.1 Polipler

Polip terimi, Yunanca da bir sapla mukozaya bağlı, lümeneye doğru uzantılı olan lezyonu belirtmek için kullanılmaktadır. Polipler hakkında yeterli bilgi sahibi olmak, tip ve özelliklerini iyi bilmek, hangilerinin neoplastik olduklarını anlayabilmek CRC'i (Colorectal cancer-kolorektal kanser) gelişmeden tedavi edebilmek için gereklidir (Fleisher, 1999)

2.5.1.1. Poliplerin Sınıflandırılması

2.5.1.1.1. Klinik Sınıflama: İkiye ayrılırlar;

a) **Sporadik:** Çevresel faktörlerle gelişirler ve yaşlılarda sık görülürler.

b) **Kalıtısal:** Ailevidir, erken yaşlarda ortaya çıkarlar. Bunlarda neoplastik ve non-neoplastik olarak gruplara ayrılırlar, (Fleisher, 1999).

2.5.1.1.2. Endoskopik Sınıflama

a) **Lümeneye uzantılı (polipoid ya da eksofitik):** Sesil veya saplı olabilirler (Şekil 2.13).

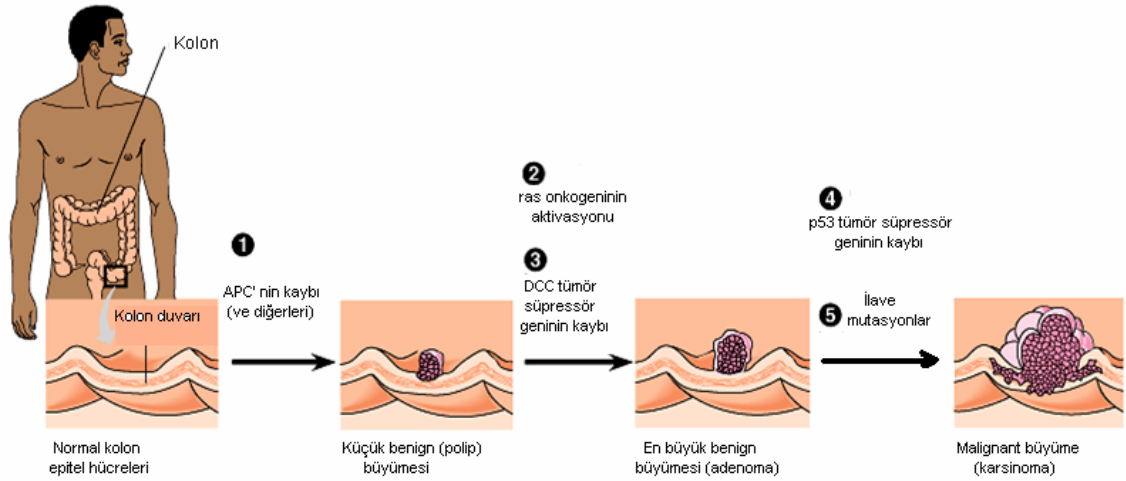
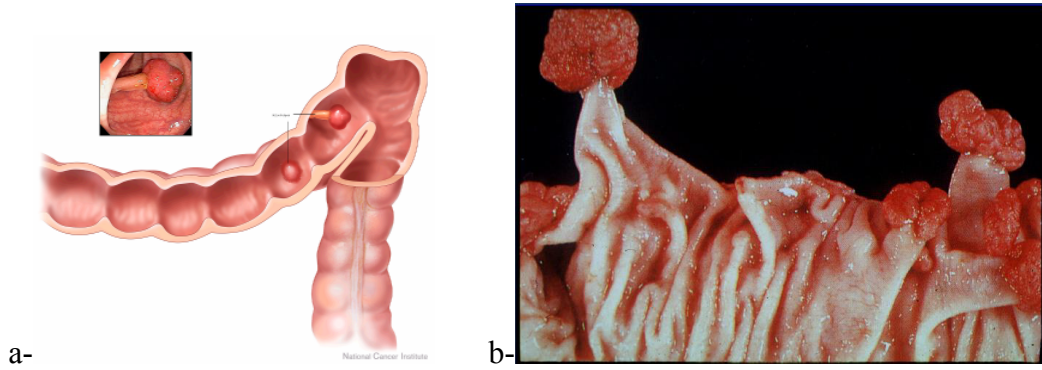
b) **Uzantsız (noneksofitik, flat) olabilirler:** Düz olanlar mukoza seviyelerine göre;

a) hafifçe yüksek,

b) düz,

c) hafifçe çökük olmak üzere üç gruba ayrılırlar.

Yasusho ve ark. ları 1997 de 115 endoskopik tanı konmuş kolorektal kanserler üzerinde çalışmış ve "flat elevated" tip kolorektal kanser de kenarlardaki düzensizliğin malign potansiyel işareti olduğunu göstermişlerdir, (Tanaka S.et al.2001). Japonya da 1997 de Takeshi deprese tip CRC de küçük deprese alanların morfometrilerinin de kanserle ilişkili olduklarını göstermişlerdir, (Smith G.A.et al 1999).



Şekil 2.13. Kolonda ortaya çıkan polipler (a,b) ve polip oluşum evreleri (internet 11).

2.5.1.2 Poliplerin Histolojik Sınıflandırması

a) Sporadik Polipler

a-1. Non neoplastik olanlar

1) **Hiperplastik polipler (Metaplastik):** Bunlar birer mukozal hiperplazi odaklarıdır. Lieberkühn kriptleri yaprak şeklinde çentiklenerek testere dişî görüntüsü alır. Kolumnar hücrelerin aralarında büyük goblet hücreleri vardır. Kriptlerin tabanı küçük yuvarlak çekirdekli düzenli hücrelerle sıralanmıştır, (Fleisher, 1999).

2) **İnflamatuvar polipler:** Devam eden veya düzlemekte olan inflamasyon odaklarıdır, rejenerasyon ya da granülasyon dokusu gösterirler, tek veya multipl olabilirler.

3) **Jüvenil polipler:** Hamartomatoz tabiattadırlar, genellikle 14 yaşından küçüklerdeki bireylerde görülürler. Non familial tiplerde 3 taneye kadar polip oluşabilir, boyları 3cm'ye kadar çıkar ve saplıdır. Hafif kırmızı, erode ve frajil yüzeyleri vardır. Kesit yüzeylerinde mukusla dolu vakoller vardır.

4) **Lenfoid polipler:** Lenfoid hiperplaziden meydana gelirler. Submukozada kolayca fark edilen, germinal merkezleri olan lenfatik agregatlar vardır, polipi kaplayan kolorektal mukoza normaldir (Fleisher, 1999).

a-2. Neoplastik olanlar

Kolorektal neoplastik poliplerde histolojik tanı başlıca displazi (adenoma) ve penetrasyon derecesine (karsinoma) bağlıdır. Poliplerin histolojik yapısal biçimleri [tübüler, villöz ya da serrated] ise malignite riskini belirler. Villöz yapı, büyük olması ve ileri düzeyde displazi varlığı malign potansiyeli oldukça artırır. Küçük poliplerin az bir kısmı yaygın karsinomaya doğru ilerler. Neoplastik polipler aynı zamanda endokrin hücrelerin proliferasyonu (karsinoidler) veya başka yerlerdeki tümörlerin metastatik implantasyonu sonucunda gelişirler.

b) Kalıtsal Polipler ve Polipozisler

Kalıtsal non-neoplastik ve neoplastik poliplerin karakterleri, sporadik poliplerinkiyle benzerdir.

b-1. Non-neoplastik polipler

1) *Familial hamartamatöz polipozis (Peutz-Jeghers Sendromu, PJS):* STK11 geniyle ilgili otozomal dominant bir hastalıktır. Polipler sesil ya da saplı, lobullü, bazen erode, hemorajik yüzeyli, 5-50 mm. boyutlarında ve yuvarlaktır, sayıları 3 ve >100 olabilir. İnce bağırsak, nadiren de mide ve kolondasınırlıdırlar. Mikroskopla hamartomalar olarak (displastik olmayan, uzamış kolonik bezleri

çevreleyen dallanmış muskularis mukoza ile karakterize) görülürler. İntestinal ve extraintestinal kanserlerin gelişim riski artmıştır (Fleisher, 1999).

2) *Jüvenil polipozis (JP)*: Tüm gastrointestinal sistemde 5 veya daha fazla jüvenil polip vardır, malignite riski taşırlar. Otozomal dominant geçişlidir. Kromozom 18q da lokalize *SMAD4/DPC4* geninde (tümör supressor gen) mutasyon ve allel kaybı söz konusudur. Nonneoplastik histoloji kanser gelişmeyeceğini göstermez.

b-2. Kalıtsal neoplastik polipler

Kalıtsal Nonpolipozis Kolon Kanseri (HNPCC): Bu hastalarda normale göre 4 misli adenoma gelişme riski vardır. İki tipe (Lynch I ve Lynch II aile tipi) ve eğer Moir-Torre sendromu da dahil edilirse üç tipe ayrılırlar. Lynch I tipi; erken yaşta başlar, otozomal dominant kalıtsaldır, sağ kolonda sıktır ve multipl kolorektal kanserler gelişir. Lynch kanseri Tip II de ayrıca extraintestinal Ca'lar (kanseri) da vardır. Moir-Torre sendromunda sayılanlara ilaveten (Tip I+Tip II) sebace adenomalar, izole veya multipl keratoakantomalar ve diğer deri lezyonları (benign keratozlar, squamoz cell Ca lar -küçük hücreli karsinomalar-bazal cell Ca lar-bazal hücreli karsinomalar-kist ve fibromlar) vardır. Erken yaşta kolorektal kanser gelişimi söz konusudur. Multipl primer senkron ve metakron kanserler gelişebilir. Amsterdam Kriterleriyle kalıtsal polipsiz kolorektal kanserin tanı kriterleri belirlenmiştir;

1- Ailenin 3 bireyinde kolorektal kanser olması

2- Bu 3 kişiden birinin diğer 2 kişinin 1. derecede akrabası olması

3- Ard arda 2 nesilde görülmüş olması

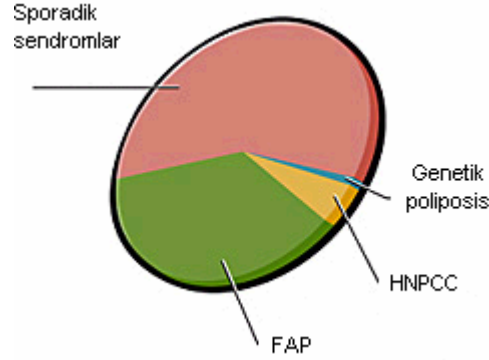
4- En az 1 aile ferdinde <50 yaş CRC gelişmesi

5- Patolojik incelemeyle kolorektal kanser tanısının konmuş olması gereklidir. Germline mutasyonları hastalığa yansır. Şimdiye kadar HNPCC ailelerinde 5 farklı DNA mismatch repair geninin mutasyona uğradığı gözlenmiştir. Bunlar; *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS1* ve *PMS2* dir. Tümör oluşumu sırasında ilgili mismatch repair geninin yabancıl allelinin inaktive edildiği, bu yüzden mutasyonun artarak tümör ilerlemesinin hızlandığı ileri sürülmüştür. Patogenezde sadece DNA

mismatch repair genlerinin değil edinsel genetik değişikliklerinde rol oynadığı düşünölmektedir.

2.6 Kolon Kanserinin Sınıflandırılması

Kolon kanseri, Familial Adenomatous Polyposis (FAP-Ailesel Ademoma Poliposis) (%20) ve Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC-Lynch Syndrome-Kalıtsal Polipsiz Kolorektal Kanser) (%5) gibi genetik, sporadik (kişide ortaya çıkan) (%75) ve famiyal (ailesel) sendromlar olarak sınıflandırılır (Şekil 2.14) (Hendon ve Dipalma, 2005).



Şekil 2.14. Kolon kanser çeşitlerinin oranları (internet 12).

2.6.1 Kalıtsal Sendromlar

2.6.1.1 Ailesel Adenoma Poliposis (FAP)

FAP (Familial Adenomatous Poliposis), kalıtsal kolorektal için klasik bir örnektir. Bu hastalık, tıp yayınlarında 100 yıldır bilinmektedir. Hastalar, periampullary (kabarcık çevresinde) karsinoma, papilla tiroit karsinoma, gastrik karsinoma, sarkomalar ve beyin tümörleri için riski de artmıştır. FAP aileleri çalışıldığı zaman, sendromun genotipik ve fenotipik heterojenitesinin farkında olunmalıdır. Bu heterojenite örneği; klasik FAP da oluşmasından kolorektal kanser başlangıcında ve proksimal kolonik tercihiyle kolonik adenomaların daha az sayısıyla karakterize olan attenuated (azaltılmış-zayıflatılmış) famiyal

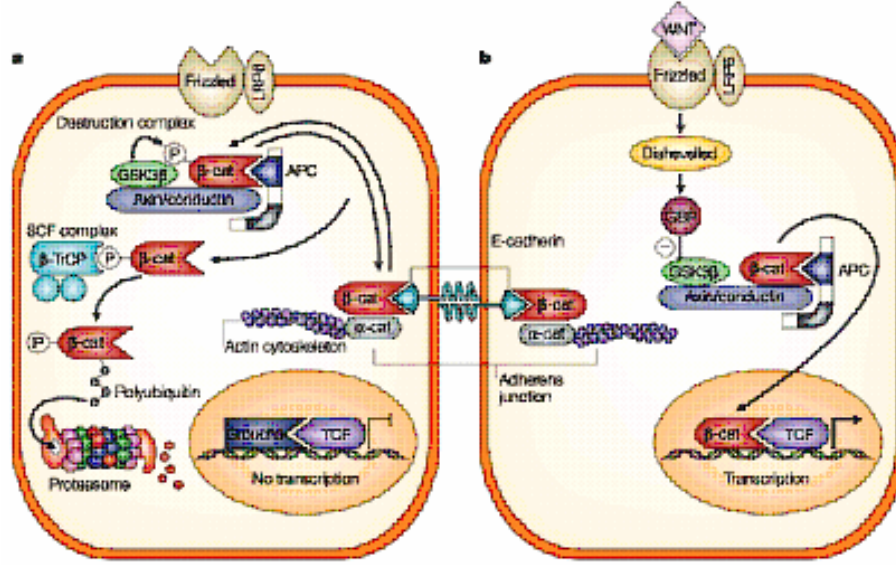
adenomatoz poliposis (AFAP) varyantı son keşiftir (Tablo 2.2). Spirio et al., 1993 AFAP için etiyolojik olan *APC* geninin 5' sonunda mutasyonu belirlemiştir. *APC* genindeki mutasyonlardan eksik çoklu adenomalı hastaların açıklaması varken, Çoklu adenoma koşulları olmadan *APC* mutasyonları ile sonuçlanır (Lynch ve Chapelle et al.2005).

FAP, otozomal dominant özelliği ile kalıtsaldır ve 10,000 kişide bir insidansa sahiptir (Lee et al. 2004). Kolon ve rektum üzerine birkaç yüz veya bin adenom poliplerin yayılması ile karakterizedir (Lee et al. 2004, Miyaki et al. 2003). Mide, duodonal, jejunoleal ve kolorektal alanlarda adenoma gelişebilir (Hendon ve Dipalma et.al.2005).

FAP, *APC* geninin germline mutasyonu ile oluşmaktadır (Lee et al. 2004). *APC*, wnt sinyal yolu (Şekil 2.15 a ve b), intraselüler adhesyonu, iskelet stabilizasyonunda, hücre siklusu düzenlenmesinde ve apoptosiste önemli rolü ile geniş 312 kD proteini kodlayan bir tümör supressör genidir. *APC* mutasyonları, c-myc ve siklin D1 gibi onkogenlerin düzensiz transkripsiyonuna izin verdiği düşünülmektedir (Conlin et al. 2005).

WNT yol ağı kanser gelişiminde oldukça önemli mekanizmaları içermektedir. WNT sinyal eksikliğinde, serbest intraselüler β -catenin seviyesi proteozomda bozulması için azalır. Adheren bağlantılarda β -cateninle dengelenen serbest sitoplazmik catenin, APC, axin/conductin ve glikojen sentaz kinaz 3'ü (GSK3) içeren yıkım kompleksini çalıştırmaktadır. F-box protein β – TrCP içeren SCF kompleksiyle tanınmasına izin veren GSK3, β -catenini fosforile eder. Proteasom tarafından bozulan ve β -catenin tanınmasına izin veren, SCF kompleksindeki diğer proteinler β -catenin zincirine poliubikunasyon olarak eklenmesini katalizler. Dolayısıyla, β -catenin nukleusa gelemeyebilir ve TCF-yanıtlayıcı genlere co-active edemeyebilir. Korepresör olan Groucho, β -catenin yokluğunda TCF-yanıtlayıcı genlerinin aktivasyonunda gösterir (Şekil 2.15.a).

WNT'nin varlığında, reseptörü olan LRP6 ile komplekste aktive edilmektedir. Bu durum, GSK3'ün inhibitörü GBP'yi aktive eden Dishevelled da kademeli olarak verilen sinyalin kusurlu olmasına yol açar. Dolayısıyla, β -catenin yıkım için hedeflenemeyebilir ve TCF-yanıtlayıcı genleri için ko-aktivatör olarak hareket ettiği nükleus içine serbest bırakılır (Şekil 2.15.b).



Şekil 2.15. WNT sinyal yolu (internet 13).

2.6.1.2 Kalıtsal Polipsiz Kolorektal Kanser (HNPCC-Herediter Non-Poliposis Colorectal Cancer-Lynch Syndrom)

Kalıtsal polipsiz kolorektal kanser (HNPCC), orijinal olarak “kansere aile sendromu” olarak adlandırılmış olup, *Lynch sendromu* olarak isimlendirilmiştir. Tarihi açıdan, patolog Aldred Warthin tarafından bir ailede yapılan ilk tanımlamadır. 1895 yılında çalışılmaya başlanmış ve 1913’de yayınlanmıştır. Bu aile G aile olarak bilinmektedir. 1972 yılında Lynch ve Krush tarafından yeniden çalışılmıştır ve HNPCC özelliklerine sahip olduğu ortaya konmuştur (Lynch ve Chapelle et al. 2005).

HNPCC, kolon kanserinin otozomal dominant biçimde tanımlandığı zaman 1960'ların ortasında kalıtsal kanser sendromu ilk olarak tasvir edilmiştir. Lynch sendromunun en önemli özellikleri;

a- Otozomal ve dominant olarak kalıtılır,

b-Kolon kanser için gen penetransı % 85-90,

c-Kolon kanser gelişimi erken yaşlarda görülür (=45 yaş),

d-Kolon kanserin birçoğu (%70) dalağa katlanan proksimaldedir (gövdeye yakın olan yapılardır),

e-Çoklu kolon kanserleri, sadece eş zamanlı değil farklı zamanlarda da yaygındır,

f-Prognozu kolorektal kanserden daha iyidir;

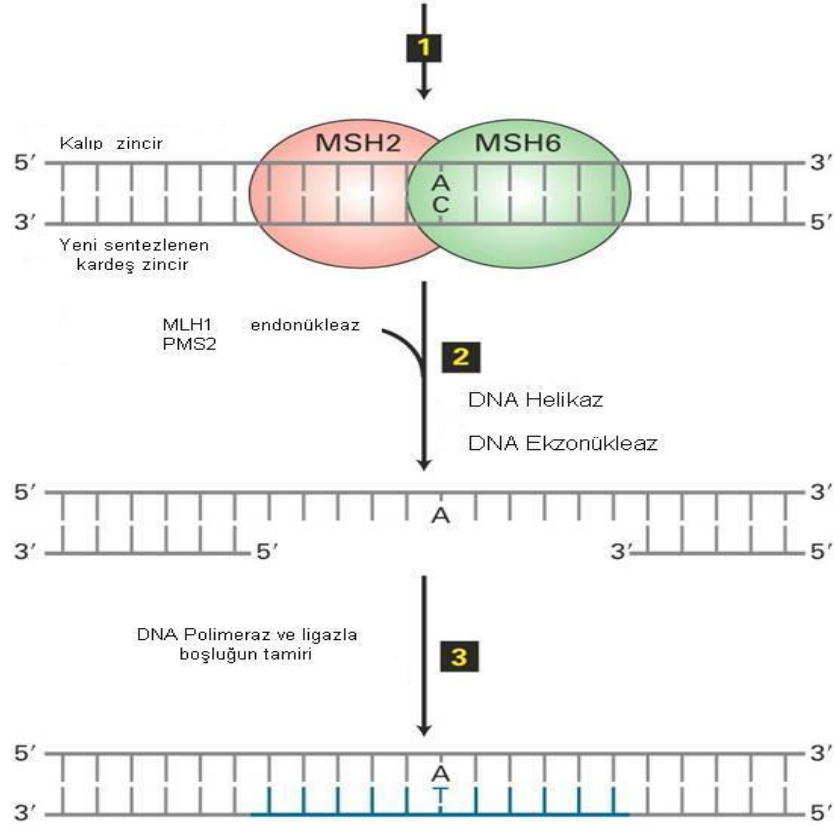
g-Kolon kanserin patolojik özelliği ayırt edilebilir (patognomik değildir) ve az farklılaşma, içerir, signet (yüzük şekilli) hücreler, medüller özellikler, peritümörel lenfotik süzülme, Crohn reaksiyon gibi ve tümör hücreleriyle karışan tümör lenfositlerin süzülmesi (TILs-tumour infiltrating lymphocytes) artar;

h-Birkaç ekstrakolonik bölgelerde malignansi için risk artışı vardır, özellikle endometrium, yumurtalık, mide, küçük bağırsak, hepatobiliyer alan, pankreas, üretral ve böbrek pelvisi gibi. Bazı HNPCC hastalarında meme kanseri ortaya çıkabilir. Warthin'nin G ailesinde, 1900' lardan önce gastrikt kanserin fazlasıyla yaygın olduğu bulunmuştur (Lynch ve Chappelle et al. 2005).

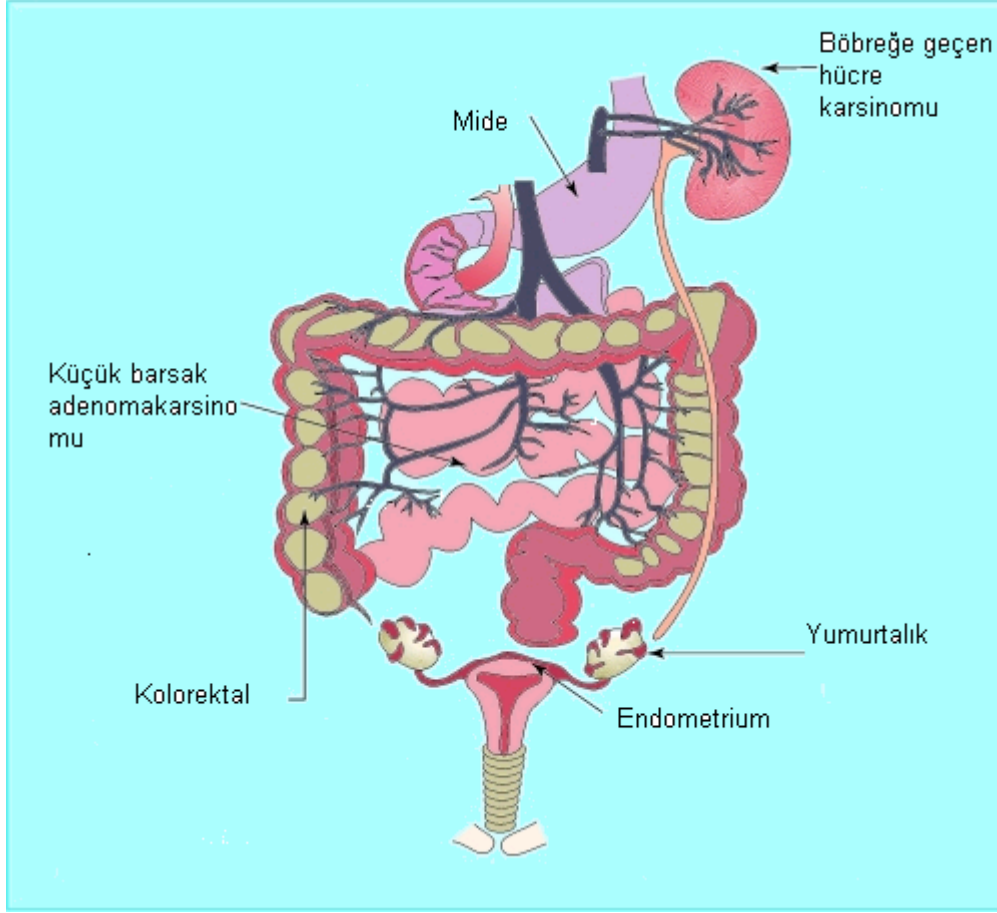
HNPCC dominant kalıtım gösterir ve kanserler çoğunlukla proksimal kolonda gelişir (Hardy et al. 2000). HNPCC (Lynch Sendromu olarak da bilinir), yaklaşık 30 yıldır ailelerde görülen, çoğunlukla kolon kanserlerinden otosomal dominant kalıtım biçimiyle ayrılmaktadır. Birçok ailede ekstra kolonik tümörlerde görülür. Özellikle jinekolojik, küçük bağırsak veya üriner alandaki karsinomlardır ve bunlar Lynch tip 2 olarak bilinir. Belirlenmiş Lynch Tip 1 bölgeye özgü kolon kanserlerden ayrılmaktadır (Cole ve Sleightholme 2000).

Mismatch tamir genlerinin üçündeki mutasyonlar, dominant kalıtılan HNPCC'ye sebep olur. Bunlar, kromozom 2p üzerindeki *MSH2*, kromozom 3p üzerindeki *MLH1* ve kromozom 2p16 üzerindeki *MSH6* genleridir (Şekil 2.16). MMR genlerindeki mutasyonlu kolon kanserli olgularda, mikrosatellit instabilite ve

replikasyon hata (RER-Replication error) formunu gösterir. HNPCC olgularında, MMR genlerindeki mutasyonlar sadece mutasyon oranını artırdığı kabul edilmiş olmasına rağmen, MMR mutasyonları kendi kendilerine başlangıçta doğrudan rol almaları da mümkündür (Houlston, 2001). HNPCC deki tümörlerin sıklığı ve bölgesi şekil 2.17’de gösterilmektedir (Cole ve Sleightholme et al. 2000).



Şekil 2.16. HNPCC de kusurlu mismatch tamir enzimlerinin kalıtımı ve olgularda (hastalarda) yüksek oranda genetik mutasyonların birikimi (internet 14).



Şekil 2.17. HNPCC de görülen tümör sıklığı ve bölgesi (Cole ve Sleightholme et al. 2000).

HNPCC'ye neden olan kolon kanserlerin oranı halen tartışılmaktadır ve yaklaşık olarak %1-%20 oranları arasında değişkenlik gösterir. En çok gözlenen oran ise %2'dir (Cole ve Sleightholme et al.2000).

HNPCC olguları, her dört insandan birinde, DNA mismatch tamir genlerinin bir dizi gen değişimi yüzünden mutasyonlardaki tamir kapasitesindeki eksikliğini gösterirler. Diğer bir allelde elde edilen fiziksel bir mutasyonla birleştirilen bir alleldeki bir dizi gen mutasyonu, bu özelliğin ortaya çıkması için gereklidir. Son bilgiler; mismatch tamir genlerinin, bazı kolon kanser durumlarında değişmekte olduğunu öne sürmektedir. Anormal mismatch tamiri, genom boyunca yayılan DNA mikrosatellit tekrar dizisinin uzunluğundaki fiziksel değişiklikler içinde yansıtılır. Ama hücre çoğalmasını ve yavaşlamasını içeren genlerdeki mutasyonların, tümör gelişiminde önemli bir rol oynaması beklenir. Örneğin;

TGFβIIIR, *IGFIIR* ve *bax* genleri, HNPCC hastalarında sık sık değişen kod alanındaki kısa tekrarları taşır (Sevignani et al. 1999).

2.6.2 Sporadik Sendromlar

Kolon kanserlerin yaklaşık % 75'nde ortaya çıkan *APC* mutasyonları genellikle *APC* proteininin azalmasına (truncate) ya da kayıp allel formunu alarak ve en erken adenomlarda gözlenir (Houlston, 2001).

Kolon kanserlerin % 70'den fazlası adenoma poliplerden gelişir ve ölüm sonrası çalışmalar, Batı popülasyonlarında adenom insidansının %30-40 olduğunu göstermiştir. Polipler olguların çoğunda asemptomatik ve sıklıkla multiplerdir. Düz (yassı) adenomlar, endoskopide farklı tanınır, poliplerin yaklaşık %10'unu açıklar ve malignanın yüksek değişim oranına sahip olabilir ya da saldırgan kanser fenotipine yatkın olabilir (Hardy et al. 2000).

2.6.3 Familial Sendromlar

Bilinen familial sendromlar kolorektal kanserlerin yaklaşık % 5'ini tanımlar. En yaygın kalıtsal sendromlar familial adenomatoz poliplerdir (FAP) ve polipsiz kalıtsal kolon kanseridir (HNPCC). Attenuate familial adenomatoz polip, gençliğe özgü poliposis sendromu ve Peutz-Jeghers sendromu nadirdir ve kolorektal kanserin mendelyan sebebidir. Familial adenomatoz poliposisde kromozom 5'deki *APC* için tümör supressör gende germline mutasyon vardır (Hardy et al. 2000).

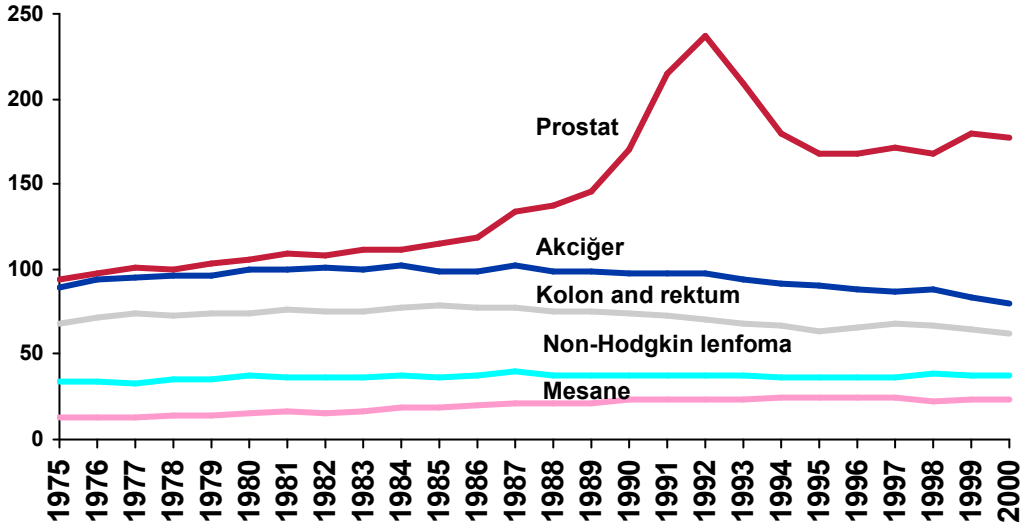
Tablo 2.2. FAP'ın klinik ve moleküler bağlantısı ve diğer kanser türleri ile olan ilişkisi.

	FAP	AFAP/HFAS	HNPCC/Lynch	UCAN
CRC'in teşhisinde yaş ort.	32-39	45-55	42-49	40-70
Kanserin yayılımı	Rasgele	Çoğunlukla sağ kolon	Çoğunlukla sağ kolon	Çoğunlukla sol kolon
Poliplerin sayısı	>100	1-100	1 (ie tümör)	
Cinsiyet oranı(kadın-erkek)	1:1	1:1	1,5-1	1:1
Polipin endoskopik görünümü	Pedüncüllü	Çoğunlukla yassı	%45 pedüncüllü; %55 yassı	Hiçbiri
Kanser oluşumuna erken adenomadan lagtime(years)	10-20	10	5	?-8
Kolonik kanserin yüzdesi(%)	1	0,5	1-5	<0,5
Süperfizyal fiziksel stigmata	%80 retinal pigmentasyona sahip	Hiçbiri	Sadece Muir-Torre sendromu	Hiçbiri
Poliplerin yayılımı	Distal kolon veya yaygın	Çoğunlukla rektalde fazlalığıyla proksimalde dalağa katlanması	Çoğunlukla proksimalde dalağa katlanması	Hiçbiri
Karsinom histolojisi	Daha çok eksoptik büyüme	Eksoptik olmayan fakat çok çeşitli	Musinde iltihaplanma artışı	Mukozal ülseratif ve iltihaplanma
Diğer tümörlerle ilişkisi	Duedonal adenoma serebral ve tiroid tümörler, medulloblastoma ve desmoidler	Duedonal adenoma	Endometrial yumurtalık, gastrict kanser, glioblastoma, diğer birçok kanser	
Gen(kromozom) mutasyonu	APC(5q21)5' distal	APC(5q21)5' proksimal	MHS2(2p), MLH1(3p21), PMS1(2p31), PMS2(7p22)	Çoklu mutasyonlar, 17p(p53), 5q(APC), 9p(p16)

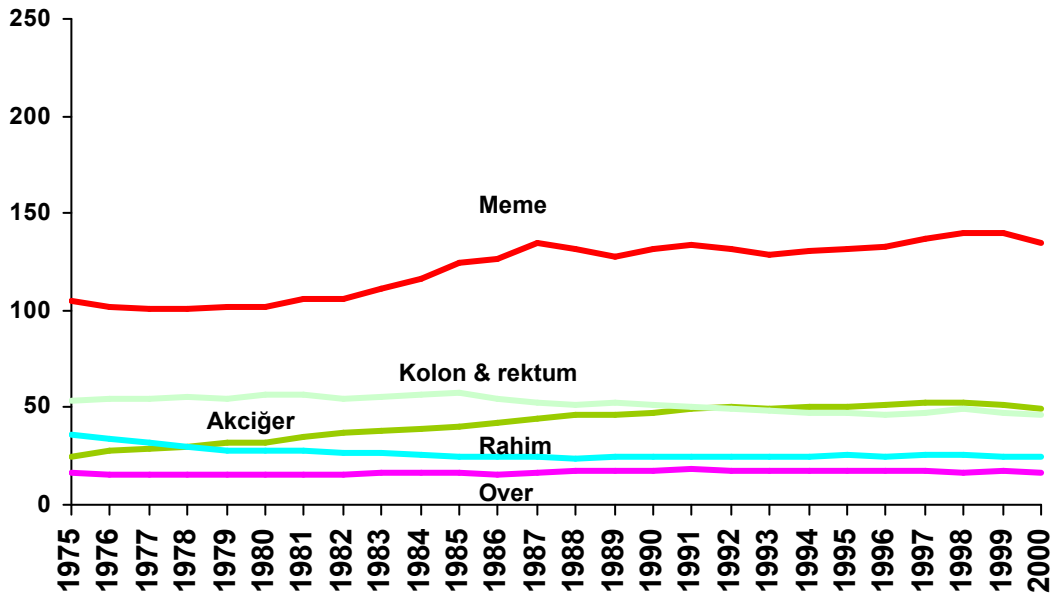
2.7 Epidemiyolojisi

Kolon ve rektumun sporadik karsinomunun gelişmiş ülkelerde kanser ölümlerinin en yaygın sebebidir. Amerika'da her yıl erkeklerde 44/100.000 ve kadınlarda 33,1/100.000 yeni olgu teşhis edilmektedir. Güney Amerika'da kolon kanser insidansı düşük olup, erkeklerde ve kadınlarda görülme oranı sırasıyla 16,4/100.000 14,8/100.000'dir. Buna karşın, Arjantin'de bu oran Güney Amerika ülkelerine göre kadınlar arasında ikinci ve erkekler arasında ise üçüncü sırada yer

alır (Pérez et al. 2006). Yaş, kolon kanser gelişimi için risk faktörüdür. Kolon kanserli olgularının yaklaşık %90'ı 50'li yaşlardadır. Bununla birlikte, genç yaşlarda da oluşabilir (Rupnarain et al. 2004). Ülkemizde yeterli güvenilirlikte olmayan sayılara göre 1.93/100.000 düzeyindedir. Kolon kanserinde dikkati çeken hususlardan bir tanesi de cinsiyet dağılımdaki farklılıklardır ve erkeklerde daha sık görülmektedir (Grafik 2.1, 2.2)



Grafik 2.1. Ülkemizde 1975-2000 yılları arasında erkeklerde kolon kanserinin diğer kanserler arasındaki eğrisi (internet 15)



Grafik 2.2. Ülkemizde 1975-2000 yılları arasında kadınlarda kolon kanserinin diğer kanserler arasındaki eğrisi (internet 15).

Kolon kanser insidans oranı, farklı coğrafik alanlarda geniş çaplı olarak değişiklik göstermektedir; Asya, Afrika ve Latin Amerika ülkelerinde kısmen daha az, Kuzey Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda ve Amerika'yı da içine alan Batı ülkelerinde daha fazladır (Smith et al. 2002, Rupnarain et al. 2004).

Göçmen popülasyonlarındaki çalışmalarda, düşükten yüksek riskli ülkelere taşınan popülasyonlar göstermişti ki, hızlı nüfus kayması, çevresel etkilerin CRC duyarlılığını etkileyebileceği göz önünde tutularak artan bir kanser riskini göstermektedir (Smith et al. 2002).

Adenoma poliplerine sahip olma veya kronik bağırsak iltihap öyküsü de riski artırır. Kolon kanser riskinin artışıyla ilişkili artan faktörler, ilksel dereceye ilişkin ailesel öyküsü, ileri yaşta hamilelik, düzensiz menstural döngüler ve geç yaşta menopozu içerir (Rupnarain et al. 2004).

Az sayıdaki çalışmada, kolon kanserin sigara kullanımı ve genetik değişimler ile ilgisini incelenmiştir. Yapılan çalışmalar daha çok spesifik bir genin değişimleri analiz etme üzerine odaklanmıştır. İlginçtir ki, Freedman et al. 1996, sigara kullananlar için, *p53* mutasyonlarının göstergesi olarak *p53*'ün üst değerlerini kullandığında sigara kullananlar için kolon tümörü *p53* negatif üst değer (*p53*^{neg}) riskinin arttığını saptamıştır. Slattery et al. 2000 ve Yang et al. 2000, sigara kullanma ile sıradan mikrosatellit instabiliteli kolon tümörleri arasında pozitif bağlantı kurmuşlardır (Diergaarde et al. 2003). Sigara kullanımı, kolon karsinomların prekürsör lezyonları, birçok kolon adenomlarla ilişkilendirilmiştir. Çalışmaların çoğunda, uzun dönemde sigara kullanımı, adenom riskini 2-3 kat artırdığı gösterilmiştir (Diergaarde et al. 2003, Miyaki et al. 2002). Sigara içmek kolon kanser vakalarında bir risk faktörüdür (Miyaki et al. 2002).

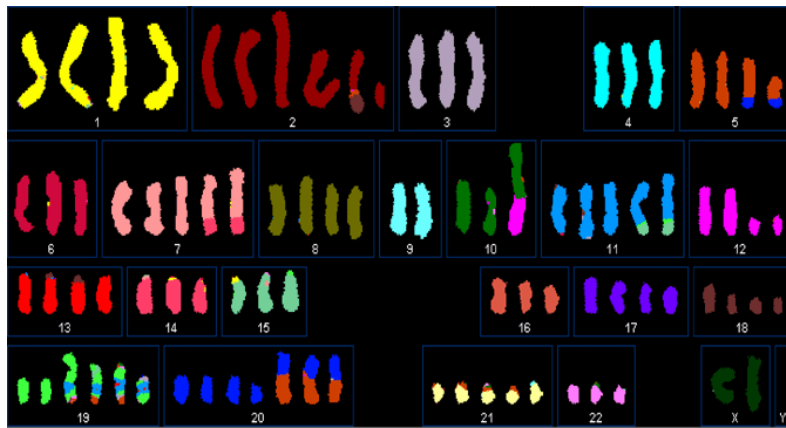
Epidemiolojik çalışmaların kanıtı sürekli bir şekilde alınan yağ ve et miktarlarının kolon kanser riski ile pozitif bir ilişkisi olduğunu göstermektedir. Bu kanıt ekolojik çalışmalar; hayvan deneyleri ve durum kontrol çalışmalarından elde edilmiştir (Boyle ve Langman et al. 2000).

Diyetin ve yaşam tarzının kolon kanseri hastalık sebebinde önemli olduğu düşünüldüğünde, bunların *p53* mutasyonlarında etken olabileceği mümkün olmakla beraber, mutasyonun lokalizasyonu ve türünü de belirleyebilme ihtimali bulunmaktadır (Slattery et al. 2002).

2.8 Kolon Kanserinde Gözlenen Sitogenetik Değişimler

Genomik sekansların yaklaşık %20'sinin ortalaması CRC de LOH'a uğrar. Bu durum büyük bir alanda tümör supressör genlerinin inaktivasyonuna eşlik eden kromozomal dizilerinin kaybına neden olur. Allellik kayıplarına ek olarak, tümör hücre genomunda kromozomal dizilerdeki artışlar, normal hücre genomu ile ilgili olarak, kanser hücresinde sitogenetik olarak gözlenen anöploidinin temelini oluşturur (Peinado et al. 1992).

Tümör oluşumunun son evresinde tipik olarak *p53* ün kaybı meydana gelir ve böyle tümörler daima anöploididir. Anöploidi $2n$ den farklı sayıda kromozom gösterir ve çoğunlukla kromozomların yapısal değişiklikleri ile karakterizedirler. Bu anöploidi, anormal mitoz sırasında kromozomların artışı ve yüksek kayıp oranından ileri gelmektedir (Bunz et al. 2002) (Şekil 2.18).



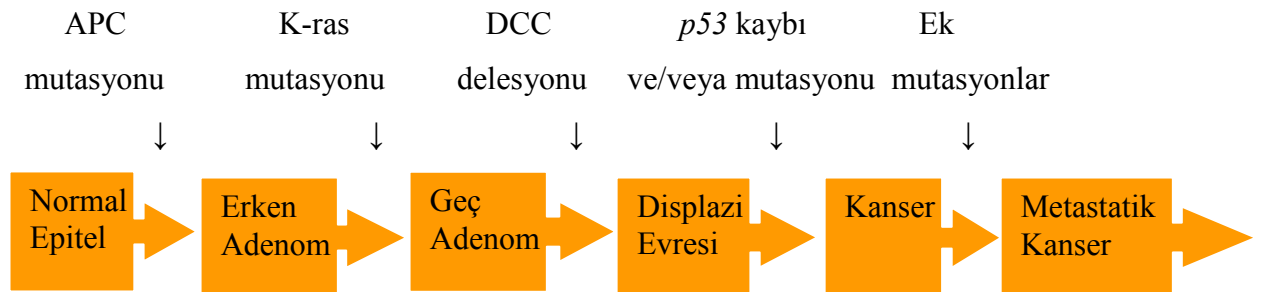
Şekil 2.18. Kolon kanserinde anöploidi (internet 17).

2.9 Kolon Kanserlerinde Gözlenen Moleküler Genetik Değişimler

Genel olarak, kolon kanser genetik değişimlerin çok basamaklı birikimiyle ortaya çıktığı kabul edilmektedir (Yamada et al. 2001). Kolon karsinomlar, onkogenler ve tümör supressör genler ya da DNA mismatch tamir gen değişimelerindeki mutasyonların sonucu olarak geliştiği düşünülmektedir (Uchida et al. 1998).

Adenomadan karsinom evrimi adenoma-karsinoma sekansı olarak adlandırılan tümör gelişiminin genellikle çok basamaklı süreç olduğuna inanılır. Bu konsept, 1970'lerin ortasında teklif edilmiş ve moleküler genetik çalışmalarıyla desteklenmiştir. Tümör gelişiminde moleküler seviyede elde edilen kanıtlar, bazı hücrelere büyüme avantajı veren progenitörleri (ataları), bu anormal hücrelerin klonal genişlemesine sebep olan genetik değişimler serisidir. Bu değişimler, *K-ras* gibi onkogen veya *APC*, *p53* ve *DCC* genleri gibi tümör supressör genlerindeki mutasyonlar olabilir (Sheikh et al. 2002). Sporadik ve kalıtsal kolorektal neoplazmalardaki moleküler genetik değişimler anlaşılmıştır ve belirgin iki yolu içermektedir;

- a- Çoğu kolon kanserlerindeki genetik değişimler adenomalarda mevcuttur ve/veya 5q kromozomu üzerindeki *APC* geni delesyonu, *K-ras* proto-onkogeninin nokta mutasyonu, kolon kanser geninin (*DCC*) delesyona uğramış kaybı ve 17q kromozom üzerindeki *p53* geninin delesyonunu içerir (Şekil 2.19) (Rashid et al. 1999).



Şekil 2.19. Kolon kanser tümör gelişimi

b-Kolorektal neoplazmanın ikinci yolunda, DNA replikasyon hataları; mikrosatellit düzensizliği (mikrosatellit instabilite-MSI), her zaman bulunan somatik mutasyonlar, *hMSH2*, *HLH1*, *PMS1*, *PMS2* ve *GTBP*'yi içeren nükleotit mismatch tamir genlerindeki mutasyonlar vardır. RER; pozitif kolorektal karsinomlar, genellikle sağ taraflıdır ve hasarlı olarak iki katlı bir hücre popülasyonu ile fark edilmektedir. Bu kanserli hastalar hayatta kalmaktadır (Rashid et al. 1999).

Neoplastik sürecin başlaması; sadece iki mutasyona gereksinim duymasına rağmen, Vogelstein ve arkadaşları, en az beş büyük genetik hatanın birikiminden sonra malignant transformasyonun oluşabileceğini önermişlerdir. Olayların çoğunda mutasyonların başlaması, *APC* tümör supressör gen lokusunda (5q21-q22) gerçekleşir. Başlangıçta, malignant transformasyonda önce polip gösterebilir ve 10-15 yıl içinde çoğalabilir (Sheikh et al. 2002).

Adenomadaki bu sistemli süreç, düzensizdir. Çoğalan bölme, kripte yüzeyine doğru taşınır ve mitoz devam eder, hücre ölümünün eksikliği ve farklılaşması ve hücre olgunlaşması gecikir. Sonunda çoğalan bölme, kripte girmesi ile sonuçlanır. Histopatolojik seviyede tanınabilen en erken ve en küçük doğru yoldan sapan kripte odağı (ACF-aberrant crypt focus) olabilir.

İnsanlarda ACF'nin iki tipi incelenmiştir. En yaygın olanı, normal hücrelere sahip hiperselüler kripttir ve hiperplastik veya non-displastik olarak adlandırılır. Çünkü önemli lezyonlara yol açar. Az yaygındır, fakat en önemlisi adenom ve karsinomların öncüsü olduğuna inanılan displastik ACF'dir ve unikriptal polipleri işaret eder. Hücresel çoğalma süreci onkoproteinler, tümör supressör gen ürünleri ve siklinler gibi düzenleyici proteinlerle düzenlenmektedir. Epidermal büyüme faktörleri gibi diğer büyüme faktörleri, büyüme faktörü-a, gastrin ve enteroglukagona transforme olurken, gastrointestinal epitelyumun çoğalan aktivitesine de etki edebilir ve kolorektal karsinogenesiste rol oynar (Sheikh et al. 2002).

Malignant hücre formları, genetik olarak büyüme faktörlerinin değişimindeki olaylar serisinin sonucudur ve onların reseptörlerini içerir. Kolon neoplazisinin ilerlemesini iki gen etkiler;

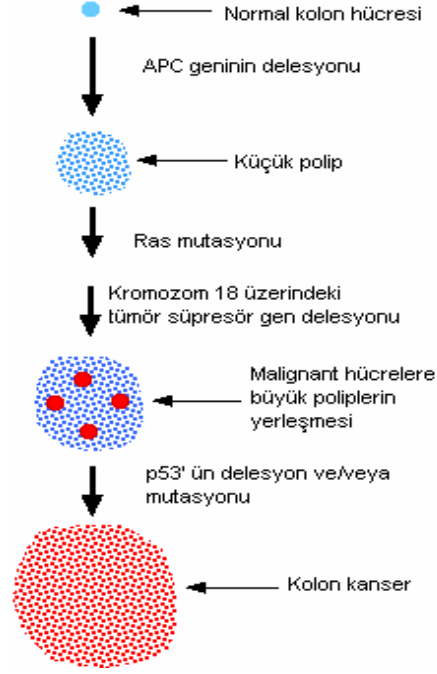
-hücre doğumunu ve ölümünü düzenleyen bekçi genler (gate-keeper) ve -gen mutasyonlarını doğrudan değerlendiren yönetici genler (carekeeper) (Rupnarain et al. 2004). Malignant tümör, bekçi genler olduğu zaman oluşur, örneğin *APC* mutanti hücre ölümü üzerine hücre oluşumunun aşırılığı ile sonuçlanır. *APC* genindeki mutasyonlar, küçük, benign tümör oluşumuyla sonuçlanır (Rupnarain et al. 2004).

K-ras, kolon kanser patogenezinde görevli bir onkogendir (Hendon ve DiPalma 2005). *K-ras*, yüksek derecede homolog onkogenlerin 3 grubundan biridir ve plazma membranlarının içinden efektör moleküllere eksternal uyarı transdüksiyonunda gerekli olan küçük bir 21 kD proteini kodlar. Bu protein normal hücrel çevrede, sinyal transdüksiyonu izleyen inaktivasyona izin veren intrinsik (esas) GTPase aktivitesine sahiptir. Aktifleşen *K-ras* mutasyonu, kolorektal tümörgenesisinde en erken oluşurken, hücrel proliferasyonu ve malignant transformasyonu düzensizleştiren ve artışına yol açan GTPase aktivitesini kaldırdığı düşünülmektedir (Conlin et al. 2005).

Normal mukozadan adenomaya değişim, mukozal hiperproliferasyonu ve DNA hipometilasyonu kapsar. Onkogen mutasyonları adenoma değişimi içindedir. Bu basamaklardan sonra allelik delesyonlar, displazi (bozuk, hatalı gelişim) kansere ilerlemede yardımcıdır (Hendon ve DiPalma 2005).

Kolorektal karsinoma gelişiminden sorumlu genler arasında, *p53* geninin inaktivasyonu, benign tümörden malign tümöre geçiş rolünü üstlendiği düşünülmektedir, çünkü *p53* geninin değişimi, kolorektal karsinomanın % 49-70'inde oluşmakta ve adenomada yoğun olarak bulunmamaktadır. Buna karşılık, bu fikir, intermukozal (mukoza içi) ve aynı karsinomanın yaygın bölümleri arasında *p53* geninin inaktivasyon sıklığının karşılaştırılmasından ortaya çıkmıştır (Kuwabara et al. 1998). *p53* tümör supressör genindeki

mutasyonlar, aktivitesinin kaybı neticesinde oluşur (Şekil 2.20) (Rupnarain et al. 2004).



Şekil 2.20. Kolon kanserin polipli modeli (internet 18).

2.10 Tümör Gelişimi

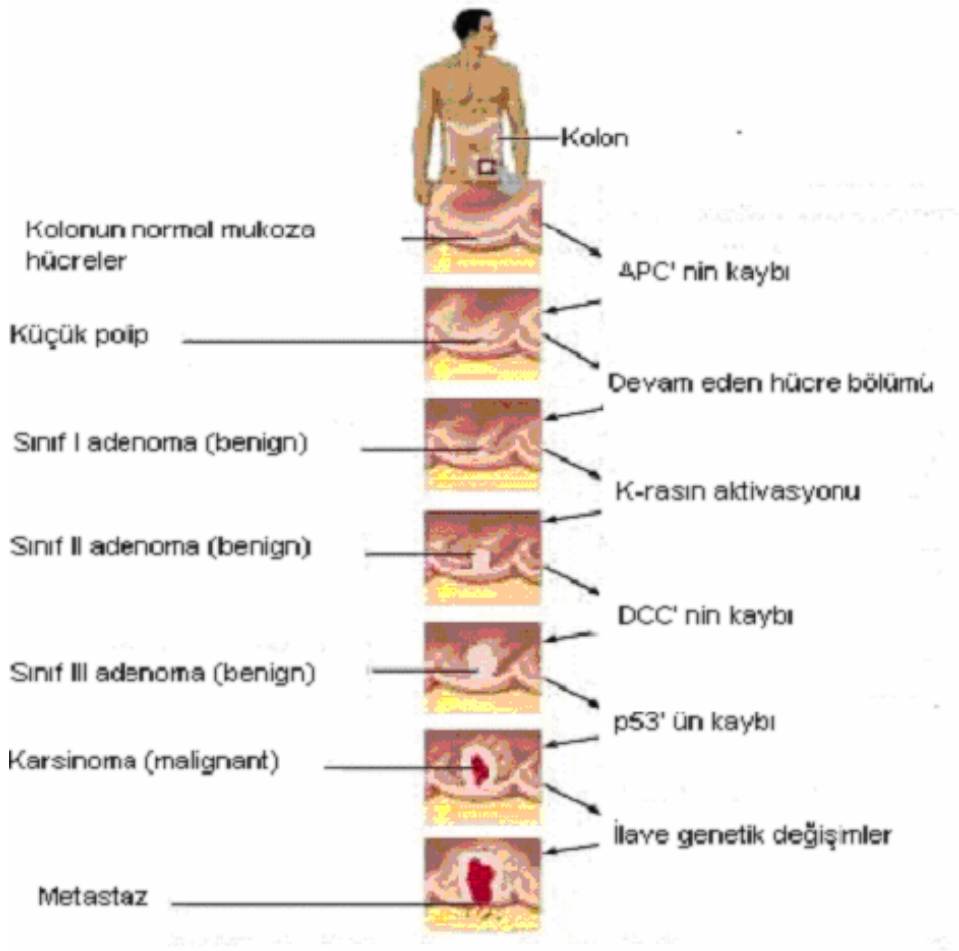
Kolon tümörleri, farklı safhanın tümörlerinin gelişimini yanına alabildiği gibi, en yaygın neoplazmaların gelişimine neden olan genetik değişimlerin çalışılması için çok iyi bir araştırma materyalidir (Fearon ve Vogelstein, 1990). Öncelikle, hiperplastik epitelyum normal görünür, yaygın olmayan, displazinin farklı safhasında adenomatoz poliplere doğru ilerlemekte ve sonunda karsinoma safhası ile sonlanmaktadır (Weinberg, 1991). Kolorektal adenomlar, önemli genetik ve fenotipik özelliklere gereksinim duyan, mukozal neoplazmaların grubudur. Histolojik olarak adenomlar, tübüler, villus ve tübülo-villus olarak sınıflandırılır. Adenomlarda, düşük veya yüksek derece dağılım gösteren hücreler, displastik hücelere sahip olabilir. Düşük dereceli displastik adenomlar, iyi huylu düzensizlik gösterirler. Diğer taraftan yüksek derece displastik adenomlar, glandular örneklerde ve/veya ekstrem sitolojik düzensizliklerde değişim gösterir (Rupnarain et al. 2004).

Kansere onkogenlerin overekspresyonu (bir genin aşırı derecede eksprese olması) ve tümör supressör genlerin inaktivasyonu sebep olur. Onkogenin overekspresyonu, düzenleyici genlerde ve/veya gen amplifikasyonunda ortaya çıkan mutasyonun sonucudur (Kovvali et al., 2003). Sadece kalıtılan değil aynı zamanda somatik genetik değişimlerin incelenmesi sağlanır, çevresel ve kalıtsal faktörlerin her ikisi de, kolorektal tümörlerin gelişimine katkıda bulunur (Fearon ve Vogelstein, 1990).

Kolonda büyük adenomların %60'ının mutant, K-ras onkogeninin aktif olduğu saptanmıştır. Poliplerin karsinoma oluşumuna doğru gelişimi, kromozom 18 ile ilişkili mutasyonun inaktivasyonu, kolorektal kanser tümör supressör genindeki delesyonu ile bağlantılıdır ve bunu kromozom 17 deki tümör supressör *p53* geninin mutasyonu ve/veya inaktivasyonu izler. Bu düzen, her zaman takip edilmez. Fakat olayların sekansını destekler. Hücrenin adenomdan karsinomaya ilerlemesinde yaklaşık olarak yedi farklı genetik değişim oluşmaktadır (Şekil 2.21). Dolayısıyla, tanımlanabilen genetik değişimlerin sekansı, malignant hücre gelişiminin genomda ardarda birikimi olarak kabul edilebilir (Vogelstein et al. 1989). Kolon kanser gelişimi ve kolorektal kanser genindeki (fonksiyonun bozulması) delesyon ile heterozigosite kaybı arasındaki ilişki açıktır ve aynı zamanda karsinogenesisindeki bu değişimlerin kronolojisi ile ilgili tutarsızlık vardır (Kataoka et al. 2000). Gastrik ve kolon kanserleri muhtemelen karsinogenesis için aynı genetik temeli paylaşır (Uchino et al. 1993).

Kolon karsinomaları, yassı veya bastırılmış poliploid olarak tanımlanabilen adenomalardan gelişir (Morson 1984; Muto et al. 1985; Kudo 1993). Yassı veya bastırılmış tümörler, malignant potansiyele sahip daha büyük poliploid tümörler olarak tanımlanmıştır (Wolber ve Owen 1991). *APC-Ras-p53* yol ağı kolon kanseriyle sonuçlanan indüksiyon yol ağıdır. Bu yolun iki bileşeni olduğu ileri sürülmüştür: kromozomal instabilite (CI) ve mikrosatellit instabilite (MSI). Kromozomal instabilite yolu, mikrosatellit instabiliteyle ve heterozigosite kaybıyla karakterize edilmiştir (Lengauer et al. 1998).

Mikrosatellit instabilite yolu, klonal seçimle sonuçlanan DNA tamir genlerinin geniş (kapsamlı) birikimine neden olur. Mikrosatellit instabilite⁺ fenotipi genomda tekrarlayan bölgelerin allelik değişimiyle karakterize edilmiştir (Aaltonen et al. 1993). İnsan tümörlerinde somatik oluşan mikrosatellit instabilite, uzun nükleoitit tekrar sekanslarının değişimlerinden oluşur. Bu mekanizma HNPCC de bulunan germline defektlerden de sorumludur. Mikrosatellit instabilite insidansı kolorektal kanser için yaklaşık % 25 ve adenomlar için %15 olarak rapor edilmiştir (Hardy et al. 2000). Genler tekrarlı domainleri (işlevsel bölge-bir proteinde özgül bir işlev gösteren amino asit dizilerinin olduğu bölge) içerirken mikrosatellit instabilite genellikle hedef olmaktadır, mesela, *bax* geni, kolon tümörgenesinde fonksiyon kaybına yardımcıdır (Rampino et al. 1997).



Şekil 2.21. Hücrenin adenomadan karsinomaya ilerleyişi (internet 19).

2.11 Tümör Hücre Heterojenitesi

Kanser genetik değişimleri içeren çok basamaklı sürecin değerlendirilmesi ile ortaya çıkar. Bu değişimler, normal hücrenin değişiminde klinik olarak tanımlanabilen malignant hücre oluşumu ile sonuçlanır. Kanserın çok aşamalı gelişim modeli, onkogenlerin normal hücrelere doğrudan girişini içeren karsinogenesis deneylerinin ve çok aşamalı premalignantın malignant tümöre transisyonu morfolojik incelemelerle desteklenmiştir. Son söylenen en önemli örnek, Hahn et.al, 1999'da tarafından yapılmış deneylerdir, Biyotıp araştırması için Whitehead Enstitüsü, insan tümörünün oluşmasının birkaç bağımsız aşama ihtiyacı olduğunu göstermiştir. Bu deneyler, normal hücrelerde üç genin ortaya çıktığı zaman, immünolojik olarak hatalı farede, normal insan hücreleri tümör büyüme eğilimli kanser hücrelerine transforme olabildiğini göstermiştir. Yapay olarak ortaya çıkan genler, telomerazı kısaltarak üstesinden gelen (overcome) telomerazdır; *ras* onkogeni, ve *SV40* geniş T-hücre antijeni tümör supressör genler *p53* ve *RB*'yi inaktive ederler. Bu genlerin eş zamanlı varlığı hücre transformasyonu için gereklidir (Ambs et al. 1997)

Böylece, mutasyonla ilişkili tek kanserli hücre monoklonal olarak genişlemenin başlamasına rağmen, sonradan mutasyonlar kanserin çok aşamalı gelişimine gereksinim duyar. Bu sürecin doğal sonucu, yeni klonal gelişimi verir. Bu sürecin farklı subklonal evrimi, başlı başına subklonlarda yeni işaret (new marker) kromozomlarının ve anöploidi artışının belirmesiyle ilişkilidir (Indulski and Lutz 1997).

Tümör hücre heterojenitenin bu gelişimi, klinik olarak önem taşır, çünkü klinik olarak, büyüme oranı, metastatik potansiyel ve kemoterapiye hassasiyeti gibi biyolojik davranışında farklı olan hücrelerde biyolojik çeşitlilik ortaya çıkarır. Bu nedenle, kemoterapi kombinasyonu, genellikle sadece ilaçla tedaviden daha yararlı olduğu bulunmuştur. Benzer olarak, tümör hücre heterojenitesi, terapide incelenen spesifik B-hücre lenfomalarını öldüren monoklonal antiidiyotipik antikoru kullanılarak açıklanması beklenebilir, onlar idiyotipik (Antikor ya da T

hücre reseptörlerinin değişken bölgesinde anti-idiotipik serumla reaksiyon veren idiyotoplarm tümü) değiştiğinde ve antikör tedavisiyle öldürölmekten kaçan malignant lenfositlerin alt popölasyonlarının sonradan belirmesini gösterir (Tsongalis and Coleman 1998)

2.12 Kolon Kanserinde Derecelendirme sistemi

2.12.1 TNM Derecelendirme Sistemi

TNM derecelendirme sistemi, kanserin ne kadar uzağa yayılabildiğinin doktorlar tarafından tanımlanması için standardize edilmiş bir yoldur. Her bir kanser tipi için yapılan çalışma sonuçları American Joint Committee on Cancer (AJCC), uzmanlarınca değerlendirilir. Bu uzmanlar, muhtemelen tedaviden sorumlu ve her bir kanser tipi için en iyi tahmini fikri ve tıp araştırmalarından elde edilen bilgileri yeniden gözden geçirirler. Kanserin tüm çeşitleri için derecelendirme sisteminin ayrıntıları arasında farkları azdır, asıl konsepti aynıdır. Bazıları hariç tutulursa (lösemi ve beyin tümörleri gibi) kanserin her tipi için derecelendirme sistemi için kurulmuştur:

T kategorisi: Kanserin, organda ne kadar bir alana yayılmaya başladığı ve diğer yakın organ ve dokulara ilerleyip ilerlemediği.

N kategorisi: Kanserin lenf bezleri yakınlarına yayılıp yayılmadığı (küçük bean-ölçölü immün sistem hücrelerinin toplanması).

M kategorisi: Kanserin, vücudun uzak alanlarına metastaz (yayılma) yapıp yapmadığı.

Kolorektal kanserin T kategorisi, kolon ve rektum tabakalarına doğru yayılma genişliğinin tanımlanmasıdır.

T_x: Tamamlanamayan bilgi yüzünden tümör genişliğinin belirlenmesi mümkün değildir.

T_{is}: Kanserin en erken derecesidir. Kolon veya rektumun mukozasının (iç tabaka) dışında büyümmez.

T₁: Kanser mukoza boyunca ilerler ve submukozaya yayılır.

T₂: Kanser submukoza boyunca ilerler ve muskularis propria içine yayılır.

T₃: Kanser muskularis propria boyunca subserosa içine ilerlemesini tamamlamıştır, fakat yakın doku ve organlara ilerlememiştir.

T₄: Kanser kolon veya rektum duvarı boyunca yakın doku ve organlara yayılımını tamamlamıştır.

N kategorisi, kanserin lenf bezleri yakınlarına yayılıp yayılmadığını işaret eder, eğer öyleyse, lenf bezlerinin ne kadarını kapsamaktadır.

N_x: Tamamlanamayan bilgi yüzünden lenf bezlerine yayılımı belirlenememiştir.

N₀: Lenf bezlerinde bulunamamıştır.

N₁: Kanser hücreleri üç bölgesel lenf bezlerinde bulunmuştur.

N₂: Kanser hücreleri 4 veya daha fazla bölgesel lenf bezlerinde bulunmuştur.

M kategorisi uzak organlara yayılıp yayılmadığı işaret eder, örneğin, karaciğer, akciğer veya lenf bezleri uzağına.

M_x: Tamamlanamayan bilgi yüzünden uzak alanlara yayıldığı belirlenememiştir.

M₀: Kanser uzak alanlara yayılım göstermemiştir.

M₁: Uzak alanlara yayılım gösterir. (American Cancer Society, 2005)

2.12.2 Evre Gruplaması

Bir hastanın T, N, M kategorileri, genellikle cerrahiden sonra belirlenmektedir, bu bilgi evre 0'dan evre IV'e roman rakamlarıyla ifade edilir (Şekil 2.22, Şekil 2.23, Şekil 2.24), belirlenen evre gruplaması olarak adlandırılan bir süreçle birleştirilmektedir. TNM kategorilerini nasıl takip edildiği kılavuz, evrelerinin birbirleriyle gruplaştırmıştır.

Evre 0 (Tis, N0, M0): Kanserde en erken evredir. Kolon ve rektumun iç tabakası (mukoza) dışında ilerlemez. Bu stage, intramukozal karsinoma veya karsinoma in situ olarak da bilinir.

Evre I (T1, N0, M0 veya T2, N0, M0): Kanser submukoza içinde mukozaya doğru ilerler veya muskularis propria içine de ilerleyebilir. Fakat lenf bezlerine veya uzak alanlara yayılmaz.

Evre IIA (T3, N0, M0): Kanser en dıştaki tabaka içine kolon veya rektum duvarına doğru ilerler. Henüz lenf bezlerine veya uzak alanlara yayılmaz.

Evre IIB (T4, N0, M0): Kanser yakınlardaki doku veya organlara kolon veya rektum duvarına doğru ilerler. Henüz lenf bezlerine veya uzak alanlara yayılmaz.

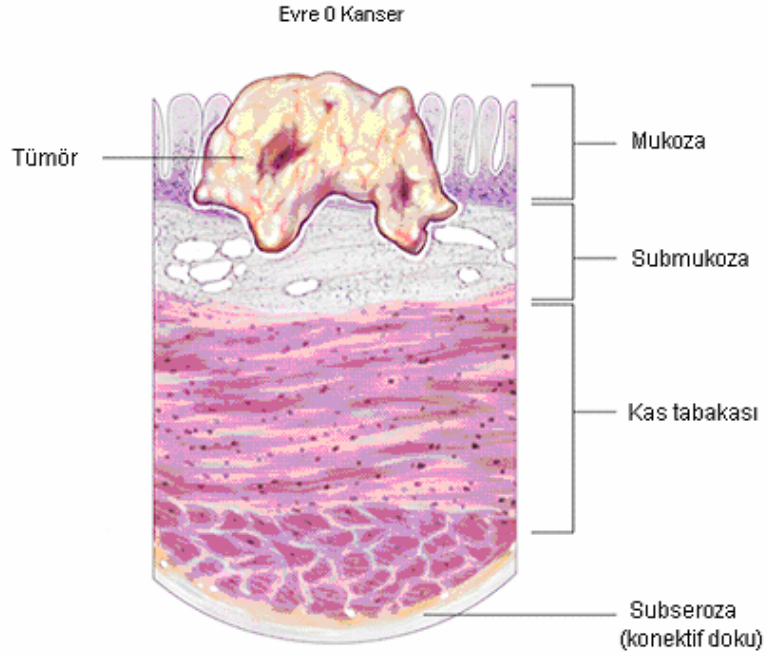
Evre IIIA (T1-2, N1, M0): Kanser submukoza içine mukozaya doğru ilerler veya muskularis propria içine doğru da ilerleyebilir ve üç lenf bezinden birine yayılır fakat uzak alanlara yayılmaz.

Evre IIIB (T3-4, N1, M0): Kanser kolon veya rektum duvarına doğru veya diğer yakın doku veya organlara ilerler ve yakınlardaki üç lenf bezinden birine yayılır fakat uzak alanlara yayılmaz.

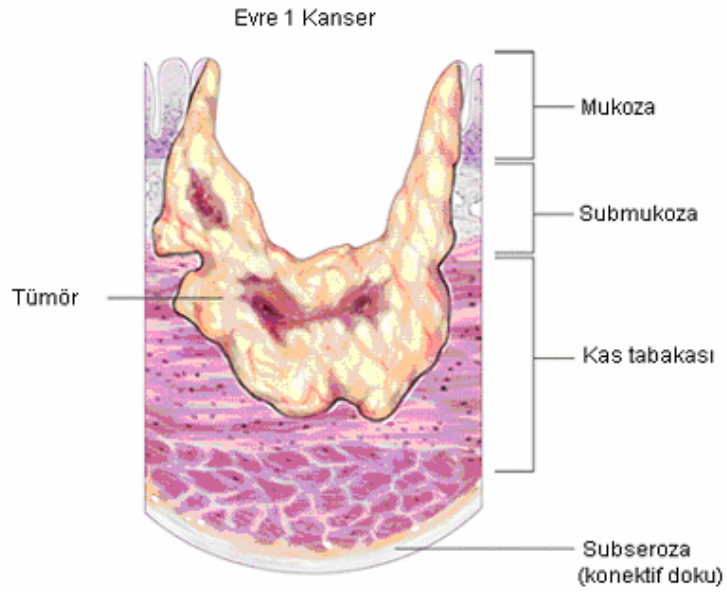
Evre IIIC (Any T, N2, M0): Kanser T kategorisinde olmayabilir fakat dört veya daha fazla lenf bezine yayılabilir fakat uzak alanlara yayılmaz.

Evre IV (Any T, Any N, M1): Kanser N, T olmayabilir fakat uzak alanlara yayılır, örneğin karaciğer, akciğer, periton (membrana uzanan abdominal çukur) (American Cancer Society, 2005)

a-



b-

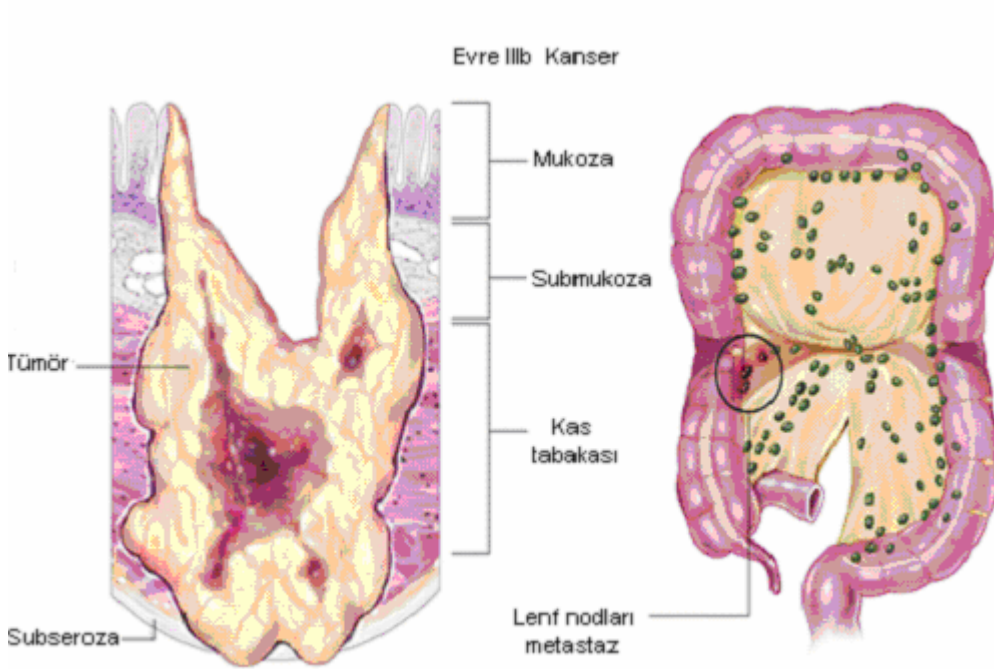


Şekil 2.22. Kolon kanserinde belirlenen evreler; a- evre 0, b-evre I (internet 20).

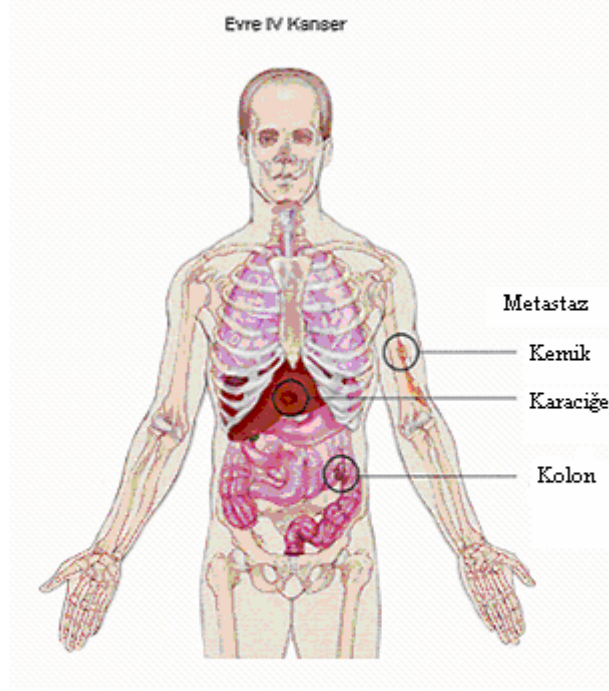
c-



d-



Şekil 2.23. Kolon kanserinde belirlenen evreler; c- evre IIa ve b, d-evre IIIb (internet 20).



e-

Şekil 2.24. Kolon kanserinde belirlenen evreler; e-evre IV. (internet 20).

2.13 p53 Geni

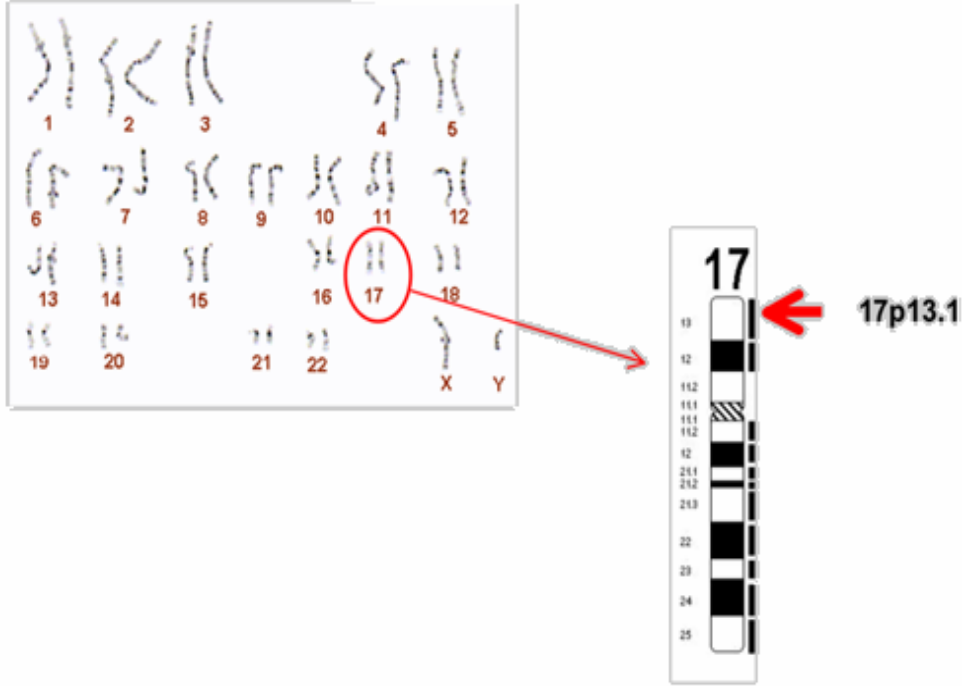
1979 yılında, simian virüs (SV40) ile transforme edilmiş hücrelerde yapılan araştırmalar sırasında viral bir antijenle birlikte çöken bir protein keşfedilmiştir (Linzer et al. 1979). Sonradan *p53* olarak adlandırılan bu proteinin, ilk çalışmalarda tıpkı onkogenlerin kodladığı onkoproteinler gibi hücre kültürlerinde hücreleri transforme edebilmesi önceleri onun da bir onkogen ürünü sanılmasına yol açmıştır. Daha sonraki çalışmalarda, proteinin yalnızca mutant şeklinin bu özelliği gösterdiği anlaşılmıştır. Kanser dokusunda *p53* mutasyonları ilk kez 1989 yılında kolon tümörlerinde saptanmıştır (Baker et al. 1989). Bu tümörlerde, hem *p53* geninin bulunduğu kromozom 17p13'deki allelik delesyon ve nokta mutasyonlarının Knudson'ın iki vuruş modeli ile uyumlu olması, hem de proteinin normal şeklinin hücre kültürlerinde transformasyonu baskılaması *p53*'ün başlangıçta sanıldığı gibi aksine tümör supressör aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Sonraki bir çok çalışmada *p53*'ün insan tümörlerinin en az yarısında (kolon, karaciğer, kemik, beyin, özefagus kanserleri) mutasyona uğradığı anlaşılmıştır (Malkin1998, Hainaut 2002).

p53 geni, virüs transforme hücrelerinde, *SV40* geniş T antijeni ile kompleks bir proteini kodlama yeteneğiyle keşfedildi (Gao ve Honn 1995). İlk açıkladıklarında, bu genin araştırılmış en önemli tümör supressör gen olabileceğini hayal edememişlerdi (Crawford ve Linzer, 1979). İlk başta düşünüldüğü üzere, *p53* geninin bir onkogen değil, bir tümör supressör gen olduğunun fark edilmesi zaman almıştır. Wild-tip *p53* ün tümör supressör gen olduğunu, ülserle ilişkili kolon kanseri ve sporadik kolon kanserini içeren çeşitli tümörlerde, kalıcı allelin mutasyonu ile beraber 17p13.1 bölgesinin delesyonu göstermiştir (Matar et al. 1999).

p53 geni genomun yapısını korumada önemli rol oynayan bir tümör supressör genidir. *p53* mutanttır veya hücre siklusunu regüle eden kısım, hemen hemen bütün kanserlerde tümör oluşumunu engellemedeki göze çarpan önemi, fonksiyonel olarak inaktive edilmiştir (Jin ve Levine 2001).

p53 geni kromozom 17p13.1'de lokalizedir (Şekil 2.25) (Yasumoto et al. 2003, Gao ve Honn 1995) ve 11 ekson içerir. En az oluşum ve splicing (kesim) mRNA 2,2-2,5 kb uzunluğunda ve her zaman ekspresedir (Gao ve Honn 1995).

p53 molekülleri DNA tamirine, büyümenin durmasına ve apoptosise neden olan transkripsiyonel hedef genlerinin, sekansa spesifik transkripsiyon faktör gibi aktiviteyi kapsayan multifonksiyonel aktivitelere sahiptir (Yasumoto et al. 2003). *p53*'ün bir transkripsiyon faktörü olduğu düşünülür. Çünkü diğer genleri aktive eder ve onların ekspresyonunu yükseltir (Sheikh et al. 2002).



Şekil 2.25. İnsan TP53 yapısı ve lokalize gen bölgesi (internet 21)

2.14 p53 Gen Ürünü (proteini)

p53 geni, DNA'ya bağlanan ve transkripsiyon faktörü olarak hareket edebilen 53 kDa'luk bir fosfoproteini kodlar (Conlin et al. 2005, Buyru et al. 2003, Krajewska et al. 2003, Hainaut et al. 1998, Hollstein et al. 1996). Hedef genlerin transaktifliği için *p53* tetramer, dimerlerin dimeri formdaki spesifik DNA sekansına bağlanır. 393 aminoasitlik *p53*'ün 3 kısmı fonksiyonel domain bölgesine ayrılmıştır;

I-transaktivasyonu içeren (1-42 residü) N-terminal kısmı (1-93 residü)

II- DNA'ya bağlanan çekirdek kısmı(102-292 residü)

III- C-terminal kısmı (323-356)

doğrudan DNA sekansına bağlanan ve en fazla *p53* mutasyonun yerleştiği ve de tetramerizasyonu içeren C-terminal domaini (323-356) ve negatif regülatör bölgesi (363-393) (Kantarci et al. 2006) (Şekil 2.26).



Şekil 2.26. *p53* protein bölgeleri (internet 22).

N-terminal transaktivasyon domaini, transaktivasyon bölgesini (1-40 aminoasitleri) ve PXXP sekansının 5 kopyasıyla prolince zengin bölgeyi kuşatır (Brázdová et al. 2002). Transaktivasyon domaini bazal transkripsiyonel mekanizma ile bağlantılı olan residüeleri içerir. Prolince zengin bölge, apoptosisin uyarılması ve büyümenin baskılanmasına katkıda bulunmak için gereklidir (Harms ve Chen 2005).

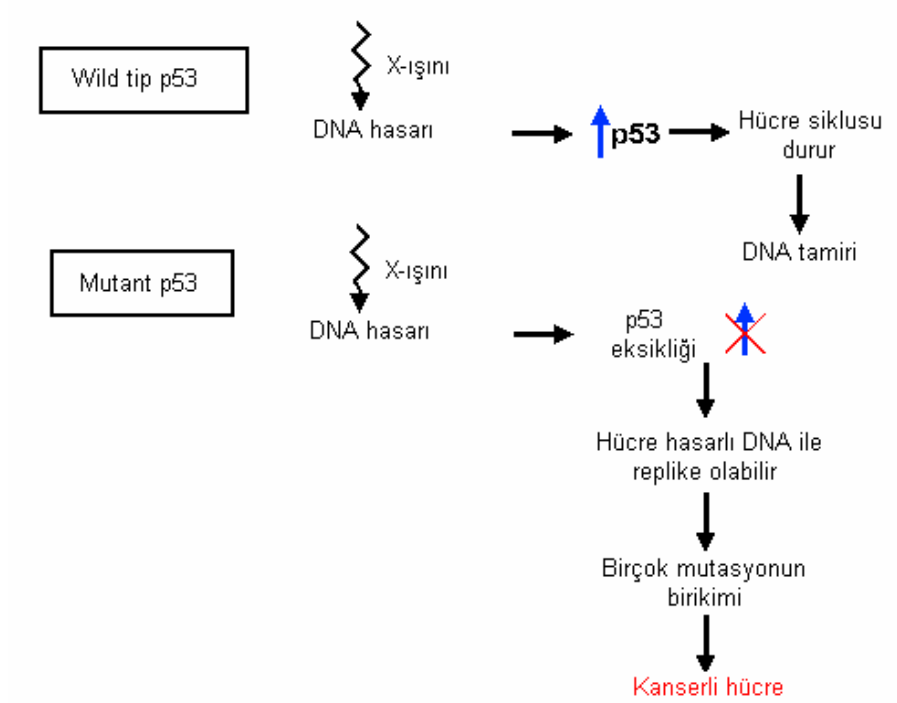
DNA'ya spesifik bağlanma aktivitesini içeren çekirdek domaininde, 3'→5' exonükleaz aktivitesi gözlenir ve insersiyon/delesyon mismatch erken rekombinasyonu taklit eden 3 iplikli DNA sustratları tek iplikli DNA'nın internal bölgeleri etkileşim halindedir (Brázdová et al. 2002).

Proteinin C terminal bölgesi esnek bağlantıları, tetramerizasyon domaini ve temel DNA'ya bağlanan C-terminal domaini içerir. C terminusun görevi, in vitro olarak gama ışınli DNA, çift iplikli DNA'daki tek iplikli gaplara bağlanmadır ve çift iplikli DNA sonları ve DNA iplikçiği transferini katalizlemek için DNA tamiri ve DNA'nın rekombinasyonundaki *p53*'ün rolü için önemlidir (Brázdová et al. 2002).

2.15 *p53* Gen Fonksiyonu

Yabanıl *p53*'ün DNA tamirinde rol oynadığı önerilmiştir ve *p53*'ün mutant formlarının ekspresyonu, gama ışınlarının sebep olduğu DNA hasarını, hücresel direnci değiştirebilir (Şekil 2.27). Ayrıca ışıktan sonra, hücre siklusu kontrol

noktası olarak fonksiyonu olduğu düşünülmüştür, mutant *p53*, radyasyona artan hücresel cevabı da değiştirebilir (Lee ve Bernstein1993).



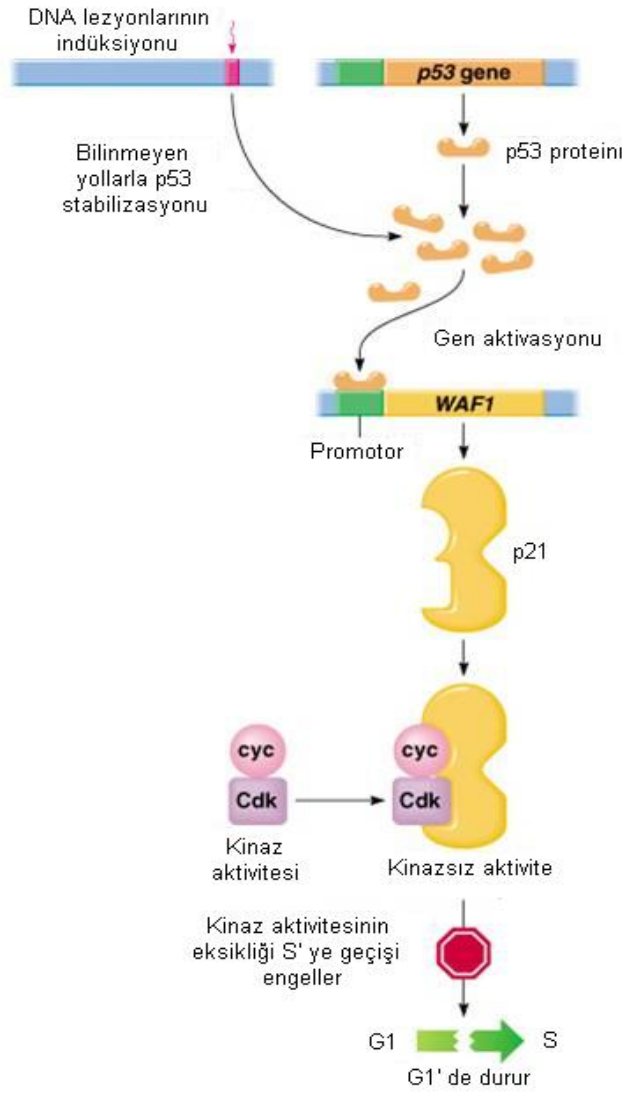
Şekil 2.27. Mutant *p53*' ün ve yabanıl *p53*' ün x-ışımına verdiği cevap (internet 23).

Yabanıl *p53* , devamlı genetik değişime sahip hücre proliferasyonunu engelleyen, genomun gardiyanı olarak görev yaptığı spekülattir. Bu durum varsa, mutant *p53* dominant negatif hareketinin sonucu olarak, yabanıl *p53* proteini eksik olan hücreler, hücre ölümünü indükleyen radyasyona maruz kalmayabilir, bu yüzden radyasyona direnç artar. *p53* spesifik sekanstan aktif transkripsiyona aracılık eder, tümör supressör olarak *p53*'ün biyolojik rolü genlerin indüklenmesini işaret eder (Lee ve Bernstein1993).

p53'ün süpresyon fonksiyonun tamamen anlaşılmamış olmasına rağmen, mekanizması, bölgeye sipesifik DNA'ya bağlanma doğrudan transkripsiyon faktörü ile olur. Muhtemelen *p53* , *WAF* (*Cip1*) geni gibi hücresel proliferasyonu inhibe eden genleri aktive eder (Wang et al. 1994).

P21 proteini (*CDKN1*, *WAF1* veya *SDI1* olarak da bilinir), hücre proliferasyonu için gerekli siklin bağımlı protein kinazların inhibitörüdür, muhtemelen sitotoksik stresi sitümülesinde koruyucu fonksiyona sahip olduğu düşünülmektedir. Genotoksinler, oksidantlar, metabolik eksiklikler ve ışınlar *p21* ekspresyon artışına neden olur (RØtterud et al. 2001).

WAF1 geni yabancı *p53* ile ilişkilidir fakat insan beyin tümör hücre dizilerinde mutant *p53* ekspresyonu gerçekleşmez (El-Deiry et.al 1993). *WAF1* (*CDKN1A*), *CIP1* olarak tanımlanmıştır (Harper et.al.1993). *WAF1* Gen ürünü siklin komplekslerine bağlanır ve siklin bağımlı kinazların fonksiyonunu inhibe eder. Normal gelişimde, *p53*'e ihtiyaç duyulmaz, fakat hücrel çevrelerde (DNA hasarı, hücrel stres), *p53* ekspresyonu uyarılır. *p53*, *WAF1* regülatör elementlerine bağlanır ve ekspresyonu transkripsiyonel olarak aktive eder. Sonrasında, siklin bağımlı kinaz substratlarının fosforilasyonunu koruyan *WAF1* proteini, siklin bağımlı kinaz aktivitesini inhibe etmek için bağlanır ve hücre siklusunu bloke eder (Şekil 2.28). Tümör hücrelerinde *p53* inaktiftir, kontrolsüz büyümeye izin veren bu yol kusurludur (El-Deiry et.al. 1993). *p53* genindeki ısıya duyarlı mutasyonların ekspresyonu, ölümsüz somatotropic progenitor hücrelerin gelişile *p53* fonksiyonu araştırılmış olur. Bu hücrelerde, DNA hasarıyla apoptosisin indüksiyonu, *p53*'ün fonksiyonuna bağlıdır. *p53*'ün fonksiyonel olduğu periyota apoptotic DNA yarığının ölçüsünün orantılı olduğunu değişken ısıli deneyler göstermiştir. DNA hasarını izleyen apoptosıs ısıli değişimini tetikler. Fakat bu durum yeni RNA veya protein sentezinden bağımsızdır. Dolaysısıyla, apoptosıs aracılı genlerin aktivatörü değildir, aksine *p53* DNA tamiri veya apoptotik süreç için enzimatik mekanizanın bileşenidir ya da hücre yaşamında gerekli genleri baskılar (Caelles et.al. 1994).

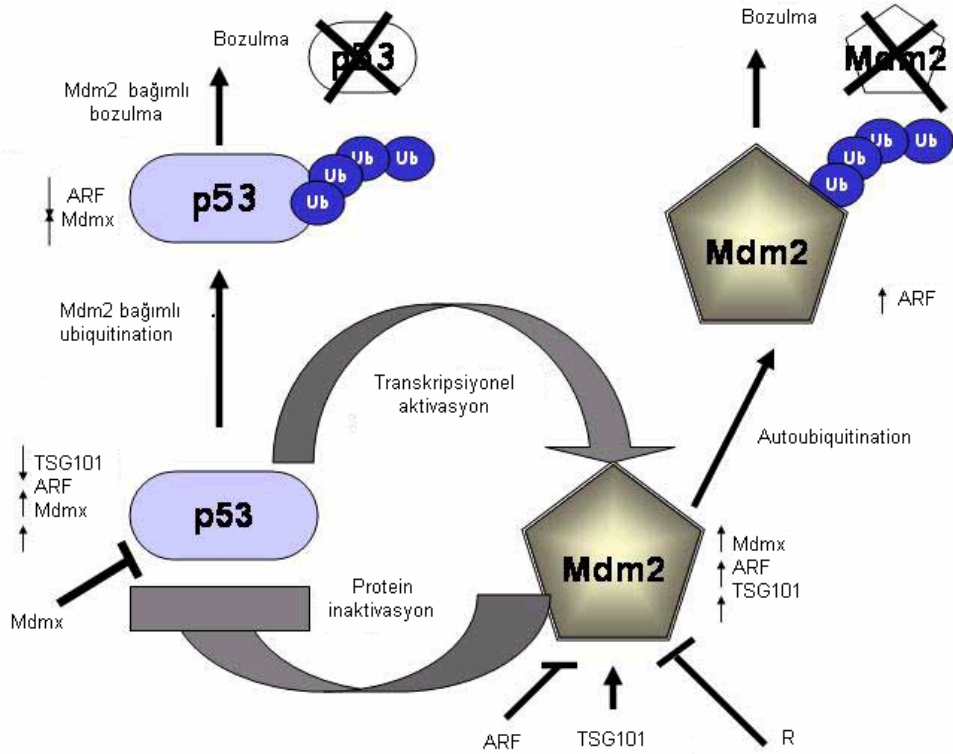


Şekil 2.28. *p53* ve *p21* genlerinin etkileşimi (internet 24).

DNA hasarı gibi çeşitli stres sinyalleri *p53*'ü aktive ve stabilize edebilir. Aktivasyon gerçekleştiği zaman, downstream hedef genlerin enhancer/promoter elementlerine bağlanır ve onların transkripsiyonunu tümör supressör fonksiyonlarının sorumlu olduğu hücrel programlarını başlatma yoluyla düzenler (Jin ve Levine et al. 2001).

Çekirdek regülör döngüsü, *p53*, *Mdm2*, *p14^{ARF}*, ve *E2F-1* içerir. Bunlar, 2 interaktif feedback loplarda organize olmuştur. *p53* ve *Mdm2*, *Mdm2* transkripsiyonun aktive edilmesiyle, pozitif olarak *Mdm2*'yi düzenler ve *p53*

ubiquitination promoting ile *Mdm2*, *p53* negatif olarak regüle eder (Şekil 2.29). *E2F-1* ve *p14^{ARF}* benzer feedback loplardır, *E2F-1*, *ARF* transkripsiyonunu aktive eder ve *p14^{ARF}*, *E2F-1*'in proteolitik degradasyonunu kolaylaştırır. Bu iki feedback lobu 2 yolla bağlantılıdır. İlki *p14^{ARF}* *Mdm2* ile ilişkilidir, *p53*'ü stabilize ederek, aracı *Mdm2* *p53* ubiquitinationu inhibe eder. *P14^{ARF}*'nin biyolojik aktiviteleri tam değilse bile, fonksiyonel *p52* sinyal eksenine (kutbuna) gereksinimi önerilir. Ayrıca, *P14^{ARF}* ve *p53* hareketi sinyal yollarının sıralı olmasından çok üst üste olmasını tercih ettiği son veride gösterilmiştir. Hücre siklusunun G2/M fazında hücrenin birikiminden önce gerçekleşen, *P14^{ARF}*'nin *p53* ve bax bağımsız apoptosisi indüklediği aynı damarda gösterilmiştir (Normand et al. 2004). İkincisi, *ARF* geninin transkripsiyonunu önler. Bu kompleks döngü *p53*'ün intraselüler seviyesi ve aktivitelerini düzenlerken ve devam ettirmesi için gereklidir. Bu döngü bütün kanserlerde kusurludur. *p53*'ün missense mutasyonları *MDM2*'nin amplifikasyonu, *ARF*'nin delesyonu veya sessizliği ve/veya *E2F-1*'in kaybı, RB mutasyon yoluyla düzenlenmesi, tümör hücrelerinde döngünün değişmesi en yaygın mekanizmadır (Jin ve Levine 2001).



Şekil 2.29. *p53*'ün *Mdm2* bağımlı bozulması (internet 25).

Hücrel stres *p53*'e doğrudan veya dolaylı olarak *p53* çekirdek regülatör döngüsünün bozulması ile *p53*'e sinyal verir. DNA hasarı, onkogen aktivasyonu, hipoksiya, hücrel ribonükleotit azalması, mitotik iplikçik hasarı ve nitrik oksit üretimini içeren birkaç stres *p53*'ü aktive eder. Protein kinazlar, histon asetiltransferaz aktivitesi ile transkripsiyonel koaktivatör kompleksleri ve diğer *p53*'ü aktive eden, mesela Sumo-1 ligazlar, PML kompleksi, Werner's sendrom proteini (WRN) ve HMG-1 protein modülatörlerini içeren *p53* upstream arabulucuları yoluyla DNA hasarı *p53*'ü aktive ederler. Bu upstream araçlarının birçoğu, post-translasyonel modifikasyonu için hedeftir. Örneğin, DNA hasarı, *p53* ve/veya *MDM2* fosforilasyonunda protein kinazlar ATM, ATR, CHK1 ve CHK2'yi aktive eder. *p53* ve/veya *MDM2*'nin fosforilasyonu, üç mekanizma ile aktive eder:

- *p53-MDM2* etkileşiminin bozulmasıyla *p53* stabilizasyonu;
- *p53* transaktivasyon aktivitenin düzenlenmesi;
- *p53* nükleer lokalizasyonunun yönetilmesi.

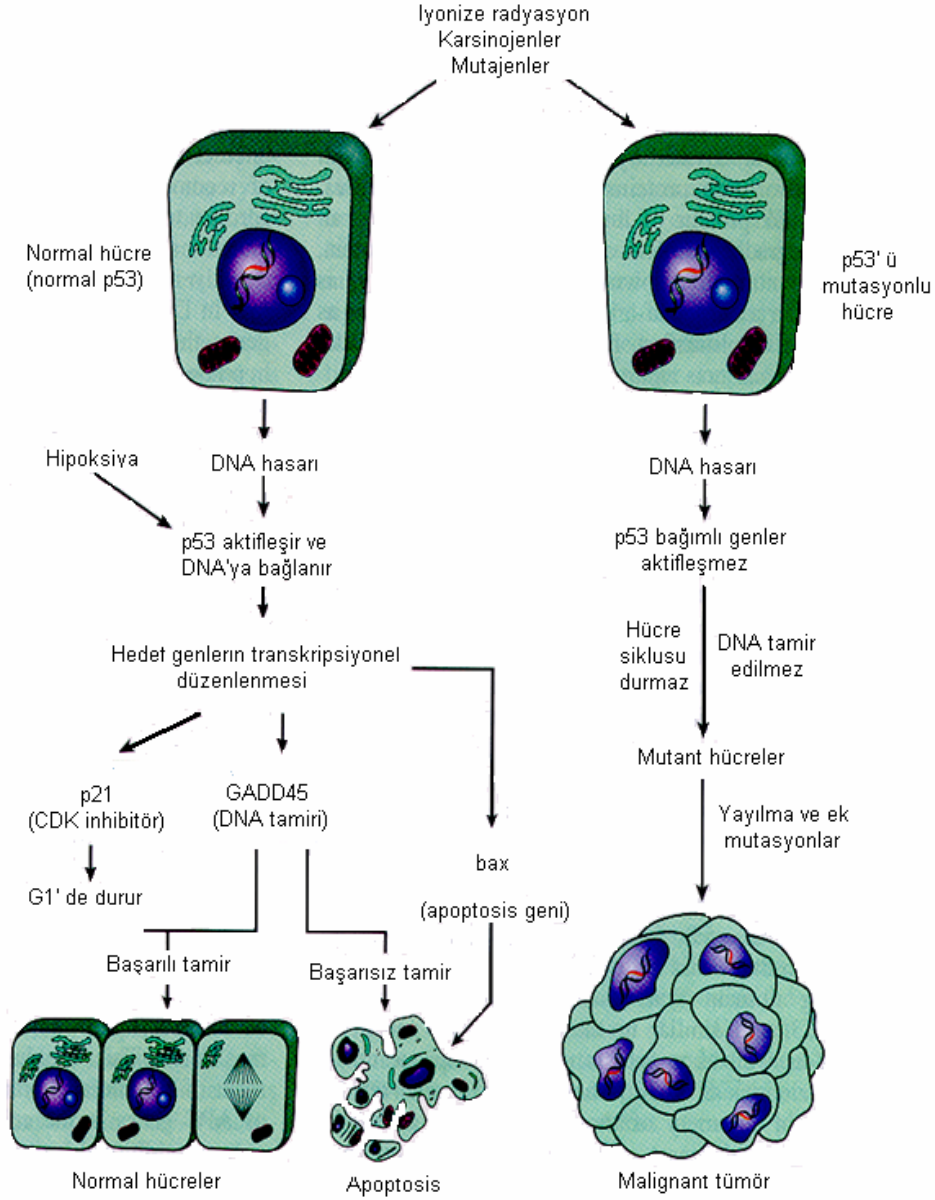
Aktive edilen *p53*, transkripsiyonlarını baskılayan veya kolaylaştıran, downstream hedef genlerinin enhancer/promoter bölgesine transkripsiyonel koaktivatör veya represör kompleksleri katılır. Bu transkripsiyon kofaktör kompleksleri DNA bağlanma afinitesi ve *p53* stabilite artışı veya azalmasında *p53*'ün kendi kendine ya asetilasyonu ya da deasetilasyonu gerçekleşir. *p53*'ün bir diğer post-translasyonel modifikasyonuna ek olarak, *p53* seviyesi ve aktivitesinin modüle edilmesi (ayarlanması) ortaya çıkar. Buna karşın, onkogenler genellikle ARF geninin aktivitesi ve/veya transkripsiyon değişimiyle *p53*'ü düzenler. Örneğin; *E2F-1*, *Ras*, *DMP1* ve *Myc* onkogenleri ARF transkripsiyonunu artırır, halbuki, *Twist*, *Bmi-1* ve *TBX2*, *p53*'ü downregüle eder. Diğer streslerle aktive edilen *p53* mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır (Jin ve Levine et.al. 2001).

Aktivasyon gerçekleştiğinde, *p53*, hücre siklusunun durması, apoptosiz, anjiyogenesis/metastazın inhibisyonu ve DNA tamirini kapsayan, birkaç hücrel programı tetiklenmesiyle, downstream efektör genlerin transkripsiyonunu baskılar. *CDC2* inhibisyonuna neden olan, 14-3-3, *GADD45*, Reprimo ve b99'un

teşvik etmesiyle G2-M fazının durmasını tetikleyebilir ya da *CDK2* inhibitörü, *p21*'in aktivasyonu ile G1-S fazının durmasına neden olabilir. Birkaç yolla aktif *Apaf-2* ve kaspas 9 gibi birçok pro-apoptosis genlerinin aktifleşmesi ile *p53* apoptosise neden olur. *p53*, *TSP1*, *BAI-1*, *MASPIN*, *GD-AiF* gibi anti-anjiyogenesis genleri ve *KAI* gibi metastas genlerini aktive edebilir. *p53*, nükleotit kesip çıkarma (NER) yolunda ve NON-S-fazı ribonükleotit redüktaz (R2) da *p48* içeren, DNA tamirindeki genleri de aktive edebilir. Sonuçta, tanımlanmamış fonksiyonlara sahip genleri baskılayabilir veya aktive edebilir. Bunların arasında siklin *G*, *EF-1 α* , *Wip1* ve *Map4* kodlar. Farklı dokuların hücrelerinde farklı hücrel stres tiplerinin, bu genlerin ve ürünlerinin aktive edilmesiyle farklı transkripsiyonel programların düzenlenmesi ortaya çıkar (Jin ve Levine et al. 2001).

Genotoksik DNA hasarı, dokudaki O₂ eksikliği, büyüme faktörlerinin mahrum edilmesi, hücre tutunmalarının kaybı ya da hücreden hücreye temas, hipoksiya gibi stresli durumlar, fonksiyonel *p53*'ü tetikleyebilir (Liang ve Clarke 2001) (Şekil 2.30). Protein kinazlar, histon asetiltransferaz aktivitesi ile transkripsiyonel ko-represör kompleksleri ve diğer *p53*'ü aktive eden modülatörleri içeren, *p53* upstream arabulucuları yoluyla DNA hasarı, *p53*'ü aktive eder (Jin ve Levine 2001).

DNA hasarı ve O₂ eksikliği gibi hücrel strese cevapta, *p53*, hücre döngüsünün durmasına ya da programlanmış hücre ölümüne neden olur. Bu durum, *p53*'ün biyolojik fonksiyonlarının birçoğu hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonundan ileri gelir. *p53* bağlantılı 2 gen, *p73* ve *p51* tanımlanmıştır. Bu *p53* bağlantılı genleri, DNA bağlayıcı, transaktivasyon ve oligomerizasyon alanları dahil *p53* bölgelerini koruyan önemli yapısal homolojiye sahiptir. Ayrıca, *p75* ve *p51*, *p53*'e yanıt veren promotorları aktive edebilir (Ishida et al. 2000).



Şekil 2.30. Normal hücrede hipoksiya durumunda *p53*'ün aktifleşmesi ve *p53*'ün mutasyona uğrayan hücrede DNA hasarı (internet 26).

2.16 p53 Protein Fonksiyonu

Tümör supressör *p53* proteini, birkaç hücresel süreci regüle eden homotetramerik bir transkripsiyon faktörüdür (Fernandez et al. 2005). Normal *p53* proteini kısa yarılanma süresine sahiptir ve değişime uğramamış hücrelerde düşük

konsantrasyonda bulunurken, mutasyona uğramış formların yarılanma ömrü uzamıştır ve böylece değişime uğramış hücrelerde birikir (Buyru et al. 2003).

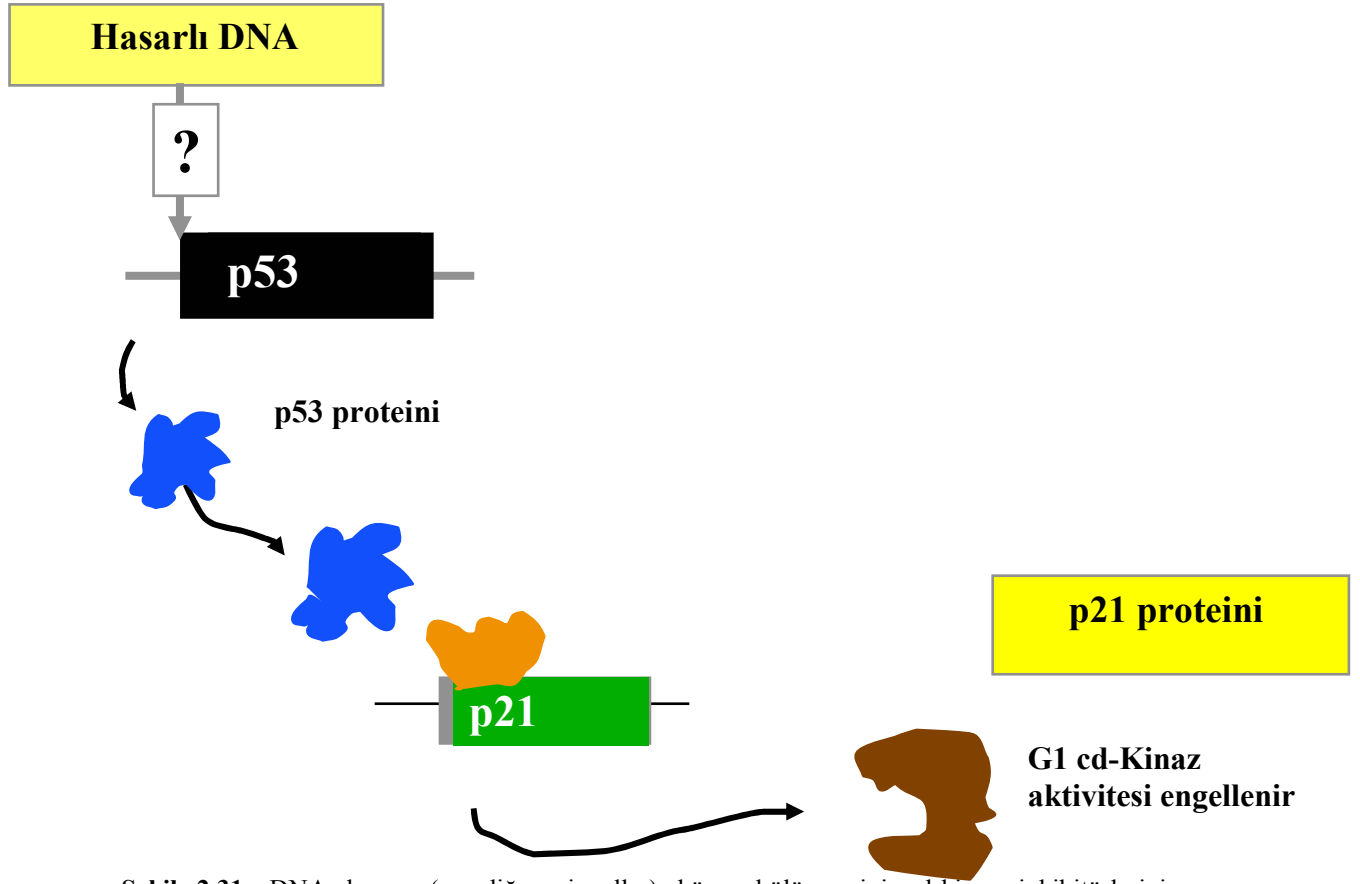
P53'ün aktivasyonu, çevredeki değişimlere 3 seviyede uyarlanabilir; bunlar,

- a) Hem yarılanma süresinin uzatılması hem de translasyonun artmasıyla, *p53* protein konsantrasyonunun artması,
- b) *p53* proteinin inaktivasyondan, aktif yapıya dönüştürülmesi,
- c) *p53* proteinin çekirdek dışındaki hücre kütesinden, hücrenin merkezine yerleşmesidir.

P53 proteinin ilk iki seviyede düzenlenmesi için çeşitli araştırmalar yapılmasına rağmen, nadir olarak *p53*'ün hücrenel alanı düzenlenebilmiştir (Liang ve Clarke 2001).

P53 proteini, hücre siklusu ilerleyişinin kontrolünde kompleks ve multifonksiyonel bir transkripsiyon faktörüdür, DNA yapısını ve hücre yaşamını DNA bozucu ajanlara karşı korur. DNA'nın hasar görmesi sonucunda, geçici nükleer birikime ve *p53* proteinin aktivasyonuna ve siklin bağımlı kinaz p21 waf-1 (hücre siklusunun negatif düzenleyicisi) ve apoptosis bax-1 (bcl-2'nin dominant, negatif inhibitörüdür) gibi hedef genlerin aktivasyonuna neden olur (Hainaut et al. 1997).

Memeli hücrelerinde, DNA hasarından sonra, büyümenin durması veya programlı hücre ölümü (apoptosis) gerçekleşir. Bu yanıtların her ikisinde tümör supressör aracılığıyla ortaya çıkar. *P53* proteini eksik olan hücreler, iyonlaşan radyasyonu izleyen G1 safhasını durdurmada başarısızdır ve apoptosise neden olan DNA hasarında dirençlidir. Normal hücrelerde, DNA hasarı *p53*'ün hızlı indüksiyonu ile stimüle edilir, hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonu izler. *p53* aracılı hücre siklusu kontrolü, *p21^{WAF1/CIP1}*'i kapsayan çeşitli hedef genlerin transkripsiyonel regülasyonu ile ilişkilidir (Şekil 2. 31). Bu gen, G1 ve S fazının gelişimi için gerekli enzimatik aktivitelerin düzenlenmesini içeren protein ürününü kodlar (Pietenpol et al. 1996).



Şekil 2.31. DNA hasarı (ve diğer sinyaller) hücre bölünmesini cd-kinaz inhibitörlerinin ekspresyonunun artışıyla durdurur (internet 27).

p53 proteini hücre siklusunu G1 safhasında durdurup, *p21* proteinin ekspresyonuna neden olurken ve proliferasyon gösteren hücre antijenini (PCNA) engellemektedir. P21'in amino terminal bölgesi, siklin bağımlı kinazı engellemiştir ve hücre siklusunun ilerlemesi ve DNA replikasyonu için 2 farklı hedef gereklidir, karboksi-terminal bölge PCNA'yı inhibe eder. Böylece tamir sisteminin harekete geçmesi için zaman tanırken, hasarlı DNA replikasyona uğramaz (Mattar et al. 1999).

p53 telafisi imkansız hücre hasarın olduğu durumlarda apoptosis meydana getirir. Apoptosis neden olan, DNA hasarı farklı hücrelerin çeşitli duyarlılıkları, hücre siklusunu regülasyonunda hücreye spesifik farklılıkları gösterir. Yabancı eksik mürin eritrolökemiya hücrelerinde ısıya duyarlı ekspresyonu ve transfeksiyonu, yabancı *p53* proteinin ekspresyonunu izleyen apoptosis neden olur. Hücre tiplerinde, *p53* aracılı apoptosis, bax geninin transkripsiyonel

aktivasyonu ile ilişkilidir. Bax geni, bcl2'le heterodimer formuyla ileri sürülür ve bcl2 fonksiyonlarının inhibe edilmesi ile bax geni apoptosisi hızlandırır. Sabbatini ve arkadaşları apoptosiste *p53* aracılı transkripsiyonel aktivasyonun gereksinimini göstermiştir. Ayrıca diğer bir çalışma, bu aktivitenin *p53* aracılı apoptosise için gerekli olmadığını göstermiştir. DNA hasarı, hücre siklusunun durmasına veya apoptosise neden oluyorsa belirlenen mekanizmalar tam olarak tanımlanamamıştır. Fakat muhtemelen intraselüler ve ekstraselüler sinyallerin her ikisinin bütünleşmesini kapsar. Örneğin; Canman ve arkadaşları, DNA hasarını izleyen apoptosise veya G1 safhasının durmasının her ikisinde intörlökinin 3 bağımlı hematopoitik hücre dizilerinde gerçekleştirme kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (Pietenpol et al.1996).

p53 genindeki mutasyonlar konformasyonda değişikliklere sebep olabilir ve böylece proteinin fonksiyonu değişir. *p53* fonksiyon kaybı DNA replikasyonunda defektlere ve hücrenin malign hal almasıyla ilişkilidir (Buyru et al. 2003).

2.17. Wild-tip ve Mutant *p53*'ün Biyokimyasal Özellikleri

Normal *p53* proteini kısa yarılanma süresine sahiptir (30 dakikadan az) ve değişime uğramamış hücrelerde düşük konsantrasyonlarda bulunur (Buyru et al. 2003, Zambetti ve Levine 1993).

Yabancı *p53*, overekspresyonu, G1-S fazında hücre siklusunu durdurur (Shaw et al. 1992). Kültürdeki tümör hücrelerinin büyümesinin inhibe eder ve onkogenlerle birlikte birincil fibroblastların transformasyonunu inhibe eder. Yabancı *p53* proteinin transkripsiyonel aktivasyon için, ihtiyaç duyduğu spesifik ve nonspesifik DNA bağlanma aktivitesini gösterir. Yabancı *p53* proteini diğer DNA virüs onkogen ürünleri gibi SV40 geniş T antijeniyle kompleksler oluşturur (Zambetti ve Levine 1993).

Son zamanlarda, Bargonetti, replikasyon orjinine yakın SV40 DNA bölgesine bağlanan yabancı *p53*'ün mutant *p53* olmadığını göstermiştir. Bunun yanında, *p53*

pozitif transkripsiyon faktörü olarak hareket edebildiğini ileri sürerken, yabancı *p53* füzyon protein gal4 DNA'ya bağlandığı domainde transkripsiyonu ilerletebildiği rapor edilmiştir. Böylece *p53*, G1'den S fazına geçişte rol oynayan genleri regüle ettiği mümkün kılınmıştır (Shaw et al. 1992).

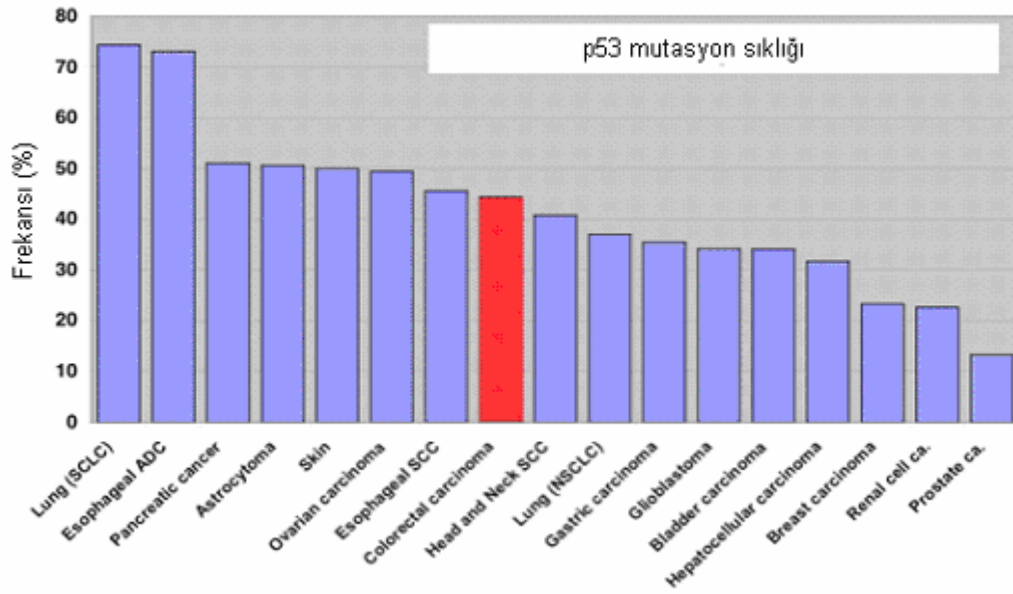
Bunun aksine mutant *p53* proteini, birkaç saate uzayan yarı ömre sahiptir (Zambetti ve Levine 1993, Buyru et al. 2003), tümör hücrelerinin büyümesinin baskılamada başarısızdır ve onkogenlerle birlikte birincil fibroblastların transformasyonunu inhibe edemez. Hassas nokta (hot spot) insan mutant *p53* allelleri, değişen derecelerde transformasyonda aktive olan ras'la işbirliği yapabilir ve bu insan mutant *p53* proteinleri SV40 geniş T antijeniyle kompleks oluşturamaz (Zambetti ve Levine 1993).

Tümör supressör *p53*, hücrede önemli rol oynar: iyonlaşan radyasyon, hücre ölümüne ve/veya hücre siklusunun durmasına neden olabilen *p53* proteinin regülasyonuna neden olur. *p53* proteinin fonksiyonu ve seviyesi (TP53'ün ürünü), birkaç bölgede fosforilasyon ve asetilasyon ve diğer proteinlerin bağlanmasıyla post transkripsiyonel olarak düzenlenir (Røtterud et al. 2001).

2.18 p53 Mutasyonu

Mutasyonlar pozisyonlarında ve doğada çeşitlidir, yaklaşık 200 kodonu etkileyen, genin merkezine baştan başa yayılmıştır. Yayılmış bütün mutasyonların veri tabanları, kanser araştırması için uluslar arası acentada korunmaktadır. *p53* mutasyon örneklerinin analizinin faydası 2 ana alanda gösterilmiştir. İlki, mutasyonların pozisyonu, *p53* proteinin çeşitli alanlardaki fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasına ve kanserde supresif fonksiyonların inaktive etmede yardımcıdır. İkincisi, insan kanserlerinde mutajenler olarak şüphelenilen mutasyon örnekleri ajanların doğasına göre değişebildiği, biyomarker olarak kullanılmasına, izin verilen *TP53* mutasyonları kanserojenlerin rolü için gösterilmiştir (Szymańska ve Hainaut 2003).

Kanser araştırmalarında ilk sırayı *p53* tümör supressör alır (Okazaki et al. 1997), çünkü mutasyonları insan malignansilerinde en yaygın genetik değişimlerdir (Li et al. 2003, Kaeser et al. 2004, Yeatman 2003, Liang ve Clake 2001) (Grafik 2.3) ve insan kanserlerinin tüm tiplerinin % 50'den fazlasında geni mutantlı olarak bulunur (Liu ve Bodmer 2005).

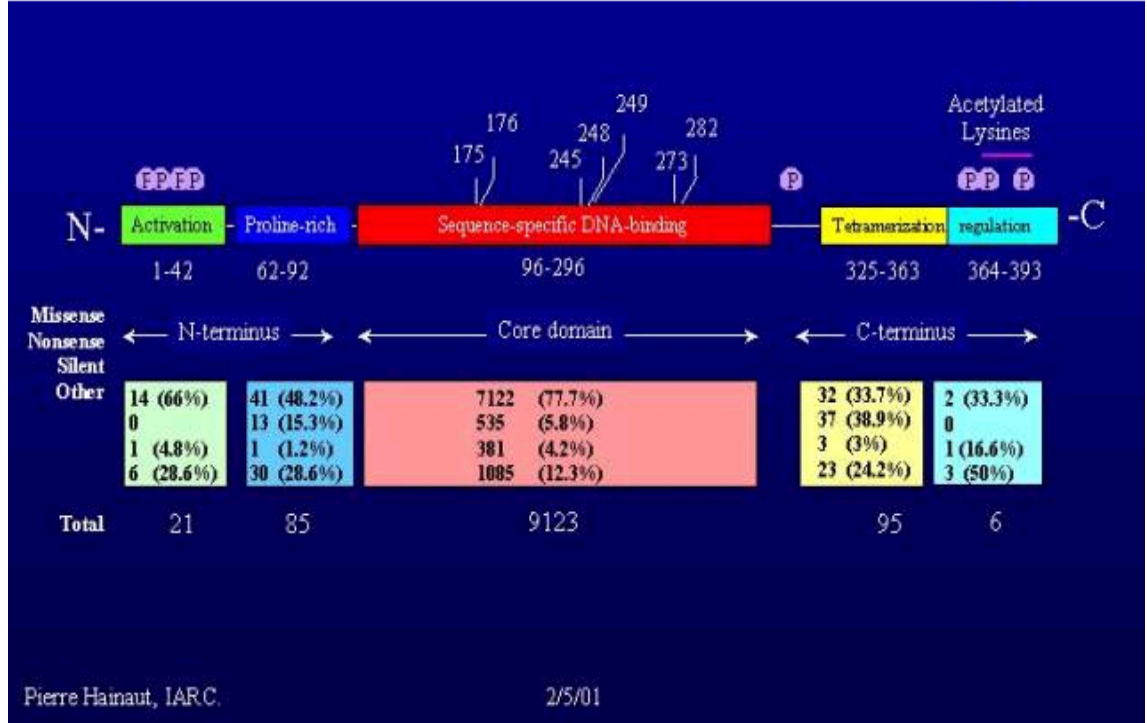


Grafik 2.3. Tüm kanserler arasındaki *p53* mutasyonunun sıklığı ve kolon kanserin bu kanserler arasındaki yeri (internet 28).

Şimdiye kadar yapılan bütün çalışmalar mutasyonlarda, moleküllerin eşit bir biçimde dağılmadığını açıkça göstermektedir. Proteinin biyolojik fonksiyondan geriye kalmış bir anahtar kodunu şifreleyen, mutasyonlara oldukça duyarlı bir DNA bölgesindeki CpG dinükleotidi ya da her ikisine de karşılık gelen hassas nokta bölgeler mevcuttur (Bérout et al. 1996).

p53 geninin 8.000'i aşkın mutasyonu tanımlanmıştır (Krajewska et al. 2003) (Şekil 2.32). *p53* mutasyonlarının spektrumu, farklı tümör çeşitleri ve etiyojileri arasında oldukça çeşitlilik göstermektedir (Okazaki et al. 1997, Krajewska et al. 2003). *p53* gen kaybı ve/veya somatik mutasyonlar hem ailesel hem de sporadik

tümörlerin çeşitli türlerinde kanserin ilerlemesi sırasında sıkça görülen olaylardır (Pearson ve Luijt 1998).



Şekil 2.32. *p53* gen bölgesindeki mutasyonlar (internet 29).

İnsanlarda *in vivo* olarak gözlenen *p53* mutasyonları, kanserin ortaya çıkabileceği hedef doku ve hücre tiplerinde tek merkezde, birden fazla farklı mutasyonları kapsayan ilk set oluşturma özelliğini bulundurlar (Hollstein et al. 1994). *p53*'deki gen değişikliği benignenden malignanta transisyonu gerçekleştirir (Mattar et al. 1999).

Nokta mutasyonu, tümörlerde bu yabancıfonksiyon kaybına neden olan en yaygın yoldur. Vogelstein ve arkadaşları tarafından tümör spesifitesinin keşfinden beri, kolorektal kanserli iki olguda *p53* genindeki missense mutasyonlar insan tümörlerinde belirlenen *p53* mutasyonlarının sayısında üssel artış meydana getirmektedir ve tahminlere göre 1995'in sonlarında 5000'i geçecektir. Frekans analizi gibi bu datanın denetlenmesi, *p53* gen mutasyonlarının yayılması ve çeşidi, insanda önemli mutasyon kaynaklarının potansiyeli hakkında sonuç çıkarmada

kullanılabilir (Hollstein et al. 1996). *p53* genindeki nokta mutasyonları insan ve köpek kanserlerinde çok yaygındır. Bu nokta mutasyonları, açık okuma çerçevesinde baştan başa olduğu bulunmuştur. Üstelik MDM2 proteinin ekspresyonu, ayrışmasını artırır ve *p53*'e bağlanır, *p53* fonksiyon kaybıyla da sonuçlanır (Kaneko et al. 2005).

Vogelstein ve Kinzler 1992, *p53* genindeki fonksiyon ve disfonksiyonunu yeniden göz den geçirmişlerdir. Onlar, *p53* inaktivasyonu için beş mekanizma taslağını çıkardılar. *p53*'ün büyümeyi inhibe ettiği, bitişik genlerin ekspresyonunu aktive ettiği ve bağlanma bölgesine tetramer olarak bağlandığı varsayılmaktadır. *p53* allellerinin her ikisi veya birinin delesyonu, büyüme regülatör genlerinin ekspresyonun artışıyla sonuçlanırken, tetramerlerin ekspresyonunda bir azalma meydana gelmektedir. Bu mekanizma, nadiren de olsa tümörlerin birkaç çeşidinde bulunmuştur. Nonsense veya splice bölge mutasyonları, sonuçta proteinin uç kısmında oligomerizasyona izin vermez, böylece *p53* tetramerlerinin azalmasıyla sonuçlanır. Bu tip mutasyonlar, akciğer, özafagus ve diğer kanserlerde yaygındır. Üçüncü mekanizma, dominant negatif etkilerinde, fonksiyonel olarak aktif tetramerlerin azalmasıyla sonuçlanan missense mutasyonları içerir. Örneğin missense mutasyonlar, kolon, beyin, akciğer, meme, deri, mesane ve diğer kanserlerde yaygındır. *p53*'lü dördüncü mekanizma, onkogenlerde geçerlidir, ayrılma ve bağlanma yoluyla *p53*'ün fonksiyonel inaktivasyonunda, insan papillomavirüsü E6 geninin ekspresyonu ile sonuçlandığı rahim kanserlerinde yaygındır. *p53* yolu, hücre gen *MDM2*'nin değişimiyle de bozulabilir. Bu gen, amplifikasyon üstünlüğü ile spontan olarak transforme fare hücre dizilerinde tanımlanmıştır (Fakharzadeh et.al. 1991).

MDM2 geninin, en yaygın insan sarkomalarındaki en önemli ve yaygın parçası amplifiye edildi ve dolayısıyla, *MDM2*'nin overekspresyonu, muhtemelen *p53* aktivitesine zarar verdiği ortaya konmuştur (Oliner et.al. 1992). DNA hasarı olduğu zaman, *p53* ser15 de fosforile edilir ve bu kanıt negatif regülatör onkoprotein *MDM2* ile etkileşiminin azalmasına yol açtığı Shieh et.al. 1997 tarafından gösterilmiştir. Bunun yanında, bu incelemeler *MDM2*'nin yeteneği ile

p53 bağımlı transaktivasyonun inhibe eksikliği DNA bağımlı protein kinazın arındırılmasıyla, ser15 ve ser 37, *p53*'ün fosforilasyonunu göstermiştir. Bu araştırmacılar, bu etkileri *p53*'ün fosforilasyonunun muhtemelen konformasyonel değişime yol açtığının kanıtı gibi sunmuşlardır. *p53*'ün ilgisi için potansiyel mekanizmayı izlediğini ileri sürülmüştür. Normal stressiz şartlar altında, *p53* inhibitörüyle ilişkili ve *p53* bağımlı transaktivasyon gösterir. DNA hasarı olduğu zaman, *p53*, konformasyonel değişime neden olan ser15 de fosforilasyon gerçekleşir, *p53* üzerine *MDM2*'in inhibitör etkisinin sonucunda ve *p53*'ün bağlanmasını *MDM2* yapar (Shieh et.al. 1997).

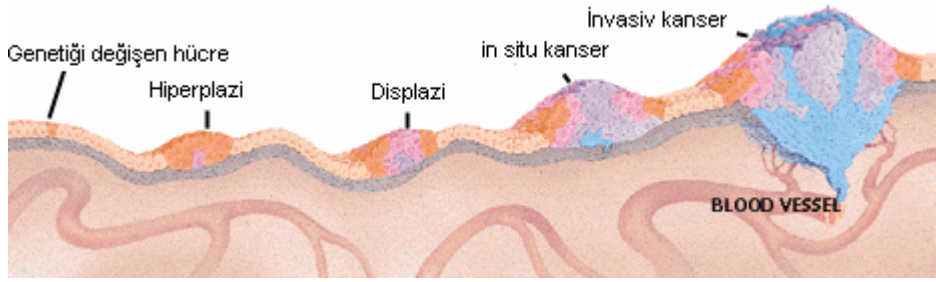
p53'ün hücrel protein *MDM2* ile doğrudan ilişkisi, *p53*'ün ayrımı ve ubiquitinasyon da sonuçlanır. *p53* ile ilişkili *JNK* için temel kanıttır. *p53* stabilite regülasyonunda aktif olmayan *JNK2*'nin rolünü araştırdı. *p53-JNK* kompleks miktarı, *p53* seviyesiyle ilişkili olarak terstir. *JNK* bağlanma bölgesi eksik *p53*, yabancı *p53* den daha uzun yarı ömür sergiler. *p53-JNK* işbirliği *p53* seviyesini artırır, halbuki *JNK*'nin mutant formunun fosforilasyonun over ekspresyonu, *p53* birikimini inhibe eder. *JNK-p53* ve *MDM2-p53* kompleksleri hücre siklusunun G0/G1 ve S/G2/M fazında bulunmuştur. Bu bilgiler, *JNK*, stressiz hücrelerde *p53* stabilitesi *MDM2* bağımsız regülatörüdür (Fuchs et al. 1998).

2.19 Kolon Kanserinde p53 Mutasyonları

p53 mutasyonları adenomadan maligne giden ilerlemenin önemli bir faktörü olarak düşünülen apoptosisin, *p53* - aracılı yollarının kaybı ile beraber kolorektal tümörlerin gelişiminde kısmen geçiken olaylar olarak açıklanmaktadır (Smith et al. 2002).

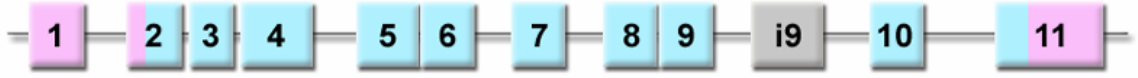
Nokta mutasyonu, tümörlerde yabancı fonksiyonun bu kaybına giden ortak bir yoldur. 1989 yılında Vogelstein ve arkadaşları tarafından kolorektalli iki hastada *p53* genindeki mutasyon ile DNA tamir genlerindeki mutasyonları keşfetmişler ve insan tümöründeki tanımlanan *p53* mutasyonlarının sayısında üssel bir artış olduğunu göstermişlerdir (Hollstein et al. 1996).

Kolorektal karsinomda *p53* mutasyona uğramış durumda iken, ilk yapılan çalışmalar bunun homojen olduğunu göstermişti. Buna karşılık, benign tümörde karsinom üzerine verilen bir rapor bunun tersini göstermiştir. İlk raporda, *p53* mutasyonel durumun komponentte heterojen ve yaygın kısımda ise homojen olduğunu açığa çıkartılmıştır. Tümör, mukoza ile sınırlandırıldığında kolorektal karsinomun subklonların çeşitli popülasyonlarla birleştirilebileceği ileri sürülmüştü. Daha sonra, bu subklonlardan biri, monoklonal yaygın karsinom oluşturarak klonal seçimden sonra alt mukozayı sarmaya başlar (Şekil 2.33). Bu, *p53* gen mutasyonu iç mukozal heterojenliğinin sonra mı yoksa karsinomun altmukozaya yayılmanın öncemi oluşturulup oluşturulmadığı hakkında belirsiz kalır (Yamada et al. 2001).



Şekil 2.33. Alt mukozayı saran yaygın kanser (Blood Vessel: Kan Damarı) (internet 30).

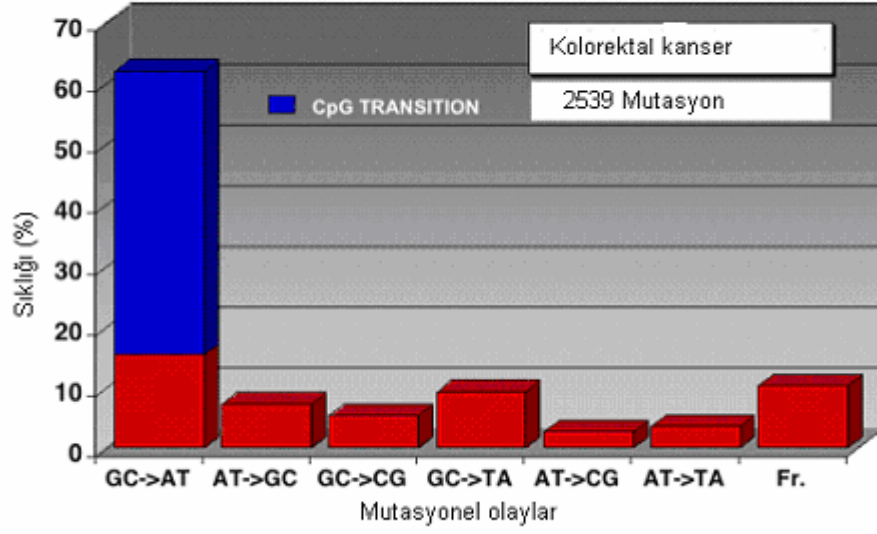
p53 tümör supressör gen mutasyonları, kolon tümör oluşumunda gerçekleşen kolon kanserinde yaygın olarak bulunmaktadır (Rupnarain et al. 2004). Kolon tümörlerinde tespit edilen *p53* gen dönüşümü oranları farklılık göstermektedir, önceki verilere göre kolon kanserinin % 75'inde değişim gözlenmiştir, yeni tahminlerde kolon tümörlerinin % 40-50 arasında değişim gerçekleştiğini göstermektedir. Kolon tümörlerinde gerçekleşen birçok mutasyon missense mutasyonlar olarak rapor edilmiştir ve bu mutasyonların kapsamlı olarak incelenen gen raporları, kolon tümörlerinde meydana gelen *p53* mutasyonlarının % 87'si, ekson 5-8 de gerçekleştiğini göstermiştir (Slattery et al. 2002). Ekson bölgeleri Şekil 2.34'de gösterilmiştir.



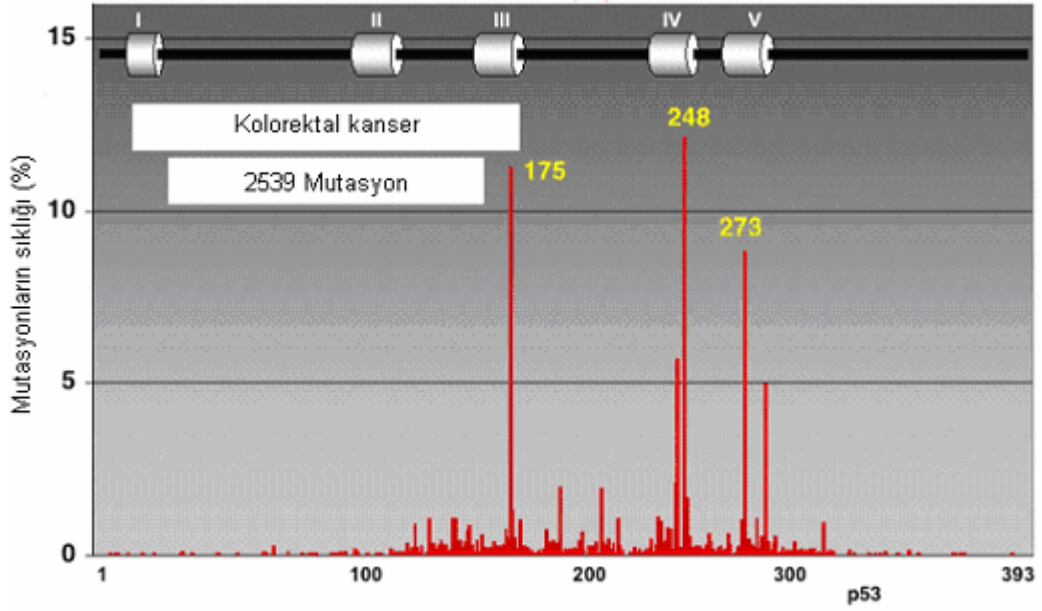
Şekil 2.34. *P53* genine ait ekson bölgeleri (internet 31).

Kolorektal kanserde *p53* geninin nokta mutasyonu, durumun yaklaşık olarak % 50-60'ında oluşurken ve kötü olgu prognozu ve tümör gelişimi ile birleşirken, *p53* genindeki allellik kayıp tümörün % 70'inde oluşabileceğini göstermektedir (Krajewska et al. 2003).

Kolon kanserindeki *p53* gen mutasyonlarının analizleri; tanımlanmış genetik hatalarının çoğunun, 5-metil sitozin deaminasyonuna yol açan endojen bir süreçle oluştuğunu öne sürülen dinükleotid CpG'deki değişiklik sıklığının çok yüksek olduğunu göstermektedir (Krajewska et al. 2003). Bu mutasyonların yarısından çoğu, 3 hassas nokta kodonunda gözlenir (Krajewska et al. 2003, Slattery et al. 2002, Mattar et al. 1999) (Grafik 2.5); *p53* geninin koruyucu bölgelere yerleşen 175, 248, 273 kodonlarıdır (Grafik 2.4) ve çoğunluğunda G:C'e A:T'e değişim olmuştur (Krajewska et al. 2003, Slattery et al. 1999). *p53* koruyucu bölgelerdeki mutasyonlar, bu bölgelerin dışında bulunanlardan daha girişken bir fenotiple birleşerek bulunurlar (Krajewska et al. 2003).



Grafik 2.4. Kolorektal kanserindeki *p53* gen mutasyonlarının sıklığı (internet 32).



Grafik 2.5. *p53* deki mutasyonların hassas nokta (hot spot) bölgelerdeki sıklığı (internet 32).

Mutasyonun olduğu kodonda ya da bölgede ve tümör doku tipine eğilim vardır. Örneğin; aminoasit 175. aminoasitteki mutasyon kolon karsinomada yaygındır, fakat akciğer kanserinde nadiren rastlanır (Zambetti ve Levine 19993).

Sporadik kolon kanserinin sürecinin genetik modele göre, karsinom, küçük ve büyük adenomlar, prekanserojen lezyonları takip eden *p53* geninin mutasyon ya da delesyonuyla kaybı, adenomun karsinomaya dönüştüğü noktayı simgelemektedir (Mattar et al. 1999).

2.20 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

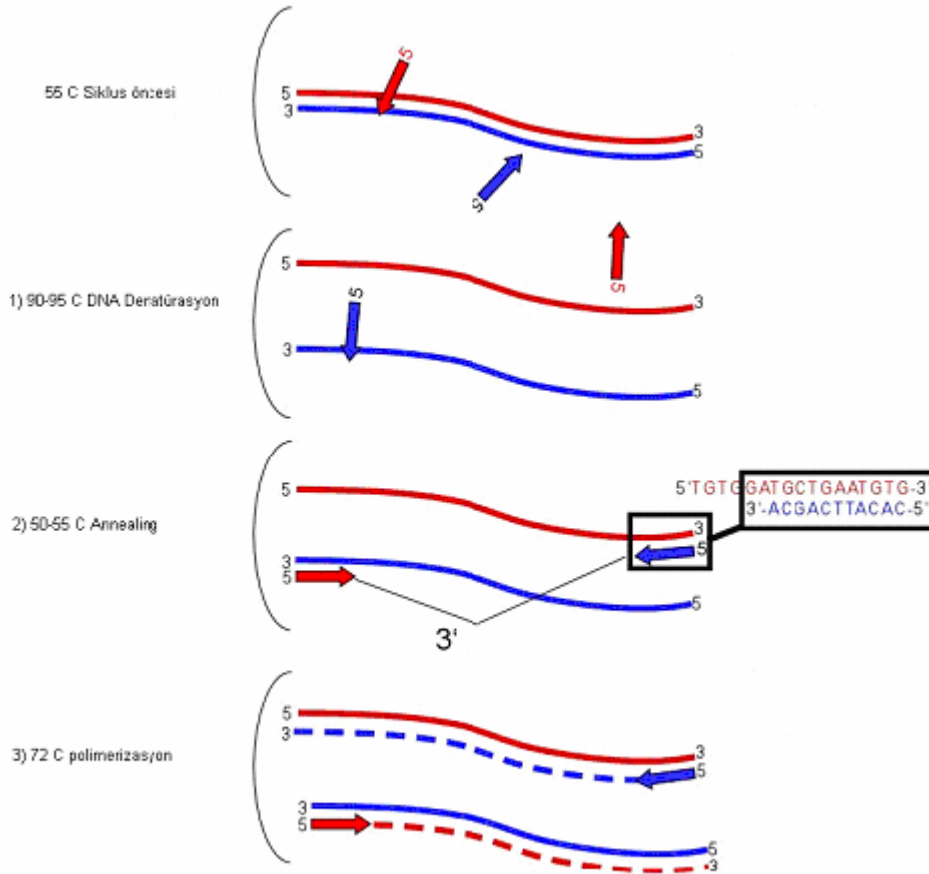
Kary Mullis'in buluşu olan ve kendisine Nobel ödülü kazandıran Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PCR), nükleik asitlerin *invitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir (Ağaçhan 2003).

PCR yöntemi ile DNA'nın çoğaltılması için reaksiyon karışımında aşağıdaki maddeler yer almalıdır:

- Çoğaltılacak olan kalıp DNA,
- Kalıp DNA'dan çoğaltılması planlanan iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlayacak olan DNA primerleri,
- Primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotitleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz,
- Sentezde kullanılacak olan deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP),
- Polimerazın çalışması için gerekli tampon görevi yapacak maddeler ve tuzlar (genellikle tris ve KCl),
- Enzimin çalışması için gerekli bir kofaktör olan magnezyum iyonları.

PCR üç çeşit sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması sonucu gerçekleşir (Şekil 2.35) . İlk basamak denatürasyon kademesidir. 95 °C'de 30 saniyeye kadar ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. İkinci basamak ise bağlanmadır (annealing). Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak

bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları kurarlar ve bu şekilde bağlanırlar. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık 50-70 °C arasında değişmektedir. Üçüncü basamak ise primerlerin uzamasıdır. Karışım DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklığa getirildiğinde primerlere bağlanmış olan enzim molekülleri bunların 3' ucuna kalıp DNA'ya uygun nükleotit DNA'ları ekleyerek DNA sentezini gerçekleştirirler. Bu üç basamak bir döngü oluşturur ve her tekrarlanışta iki primer arasında kalan özgül DNA sentezini gerçekleştirirler (Ağaçhan 2003).



Şekil 2.35. PCR'ın şematik gösterimi (internet 33).

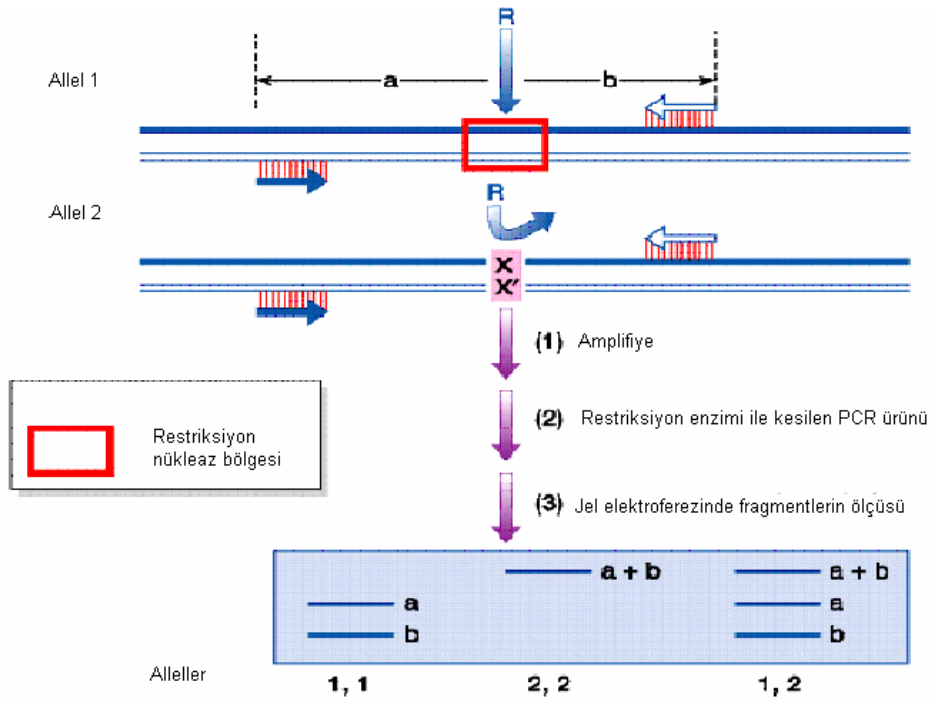
2.21 Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polimorphism-RFLP)

Genetik polimorfizm aynı bölgesi veya lokusu, aynı türün farklı bireylerinde veya kromozomlarında iki (veya daha fazla) farklı DNA dizilişine sahiptir ve bunlar polimorflar olarak tanımlanır ve genetik polimorfizmi gösterdiği söylenebilir. Mutasyonlar, genetik polimorfizme neden olur (Konuk 2004)

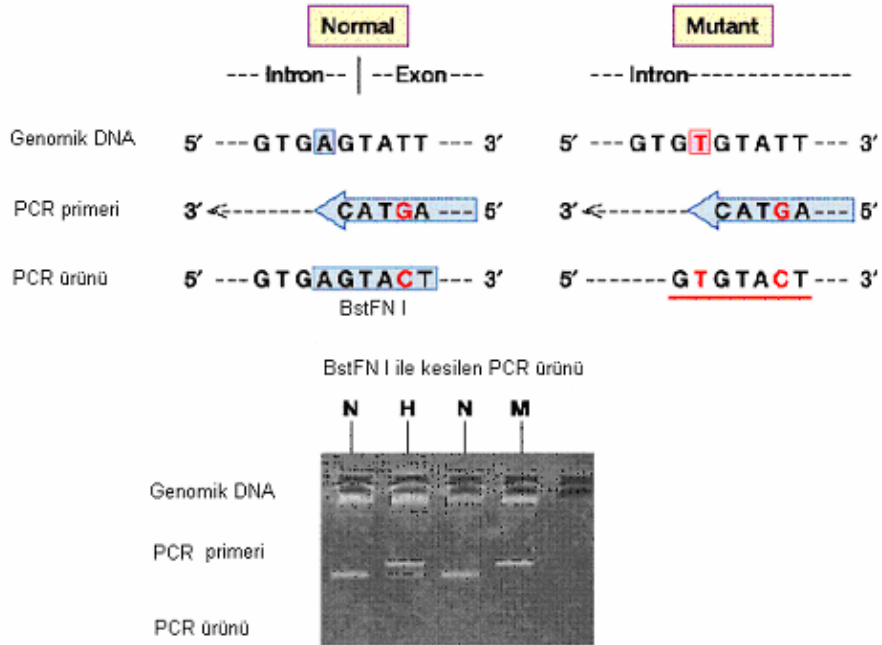
En basit DNA polimorfizmi tek baz değişikliğidir. Restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi (RFLP), DNA'yı restriksiyon enzimi ile parçalara ayırarak incelenmesine olanak tanıyan bir yöntemdir. DNA polimorfizmlerinin çoğu tek baz çifti değişimleri oluşturur. Bunlar restriksiyon enziminin tanıma bölgesi oluşturan değişimlerdir. Enzimin iki tanıma bölgesi arasındaki delesyon veya insersiyon enzim kesimiyle oluşan fragmentlerin boylarındaki farklılıklar restriksiyon fragmentlerinin uzunluk polimorfizmi (RFLP) olarak isimlendirilir (Şekil 2.34). RFLP'ler diallelik olduklarından heterozigositeleri genellikle % 50 civarındadır (Ağaçhan 2003).

RFLP'ler tek nükleotid değişimlerinden çok delesyon veya insersiyondan dolayı da olabilir. Eğer iki restriksiyon bölgesinde DNA fragmenti delesyon veya insersiyona uğramışsa restriksiyon fragmentlerinin boyları farklı olacaktır (Nussbaum 2005) (Şekil2.35).

Eğer genetik varyant restriksiyon endonükleazın kırma bölgesinde değişiklik yapmış ise normal kırma bölgesi kaybolur ve yeni bir kırma bölgesi ortaya çıkmış olabilir ve restriksiyon parçalarının uzunluğu normalden farklı olabilir. RFLP insanlarda genetik bozuklukların saptanmasında kullanılır. RFLP insan genomunda her 1 kb'da bir tek gen polimorfizmi göstermek amacıyla kullanılır (Ağaçhan 2003).



Şekil 2.36. Restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi (RFLP)'nin şematik gösterimi (internet 34).



Şekil 2.37. Restriksiyon parçası uzunluk polimorfizminin jelde görüntüsü (internet 34).

3. MATERYAL ve METOD

Çalışmamızda kolon kanseri tanılı olgulara ait parafine gömülü doku örnekleri özel patoloji laboratuvarının arşivlerinden elde edilmiştir. Parafine gömülü doku örneklerinden mikrotomda 5 µm kalınlığında 10-15 adet kesitler alındı. Dokudan öncelikle ksilol, %99,5'luk etanol, %70'lik etanol ve dH₂O kullanılarak parafin uzaklaştırıldı ve daha sonra EZNA Doku DNA hazır kiti ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen bu DNA örneklerinin varlığı PCR tekniği ile tespit edildi ve agaroz jel elektroforezde görüntüldü. Seçilen primerlerin çalışılacak olan izole edilmiş DNA uyumlu olup olmadığını belirlemek amacıyla; Gradientli Thermal Cycler cihazında, MgCl₂ konsantrasyonu için denenen aralıklar 0.22mM, 0.27mM ve 0.33mM, annealing sıcaklığı için denenen sıcaklık aralıkları 57°C, 58.2°C, 59.2°C, 61.1°C ve 64.2°C ve primer optimizasyonu yapıldı. MgCl₂ konsantrasyonu (0.27mM), annealing sıcaklığı (59.2°C) ve primerlerin uygunluğu ile optimizasyonu şartları kesinleştikten sonra amplifikasyon gerçekleştirildi ve elde edilen ampikonlar %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntüldü. p53 mutasyonu için Arg72Pro polimorfizmini ve G13964C intron 6 polimorfizmini saptamak amacıyla PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerine sırasıyla BstFNI ve BstHHI restriksiyon enzimi ile enzimatik kesim uygulandı. Enzim kesim işleminden sonra Arg72Pro ve G13964C polimorfizm veren genotipler %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntüldü. Arg72Pro polimorfizm ve G13964C polimorfizm sonuçlarının istatistiki değerlendirmesi için ise *t-testi* ile yapıldı.

3.1 MATERYAL

3.1.1. Parafine Gömülü Doku Örneklerinin Elde Edilmesi

Bu araştırmada, özel patoloji laboratuvarının arşivlerinden bulunan, kolon kanseri tanısı konmuş olgulara ait 35 adet parafine gömülü kolon tümör doku örnekleri kullanılmıştır. Bu doku örneklerine ait olgu numaraları, yaş, cinsiyet, evre ve tanı bilgileri Tablo 3.1'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Olgulara ait laboratuvar çalışma numaraları, olgu yaşı, cinsiyeti, tümör evre bilgileri ve tanısı

Olgu No	♀/♂	Yaş	Evre	Tanı
1	K	75	pT1N1	İyi diferansiye Adenokarsinom
2	K	72	pT4N ₀	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
3	K	57	pT4 Derece III	Bağırsakta Karsinomatöz Tutulum
4	K	72	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
5	K	56	pT4N ₀	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
6	K	56	pT4N ₀	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
7	K	90	pT4N1	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
8	K	56	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
9	K	78	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
10	K	70	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
11	K	58	İyi differansiye	İyi derecede differansiye
12	K	65	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
13	K	40	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
14	K	56	pT4N ₀	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
15	K	73	İyi differansiye	İyi derecede differansiye Adenokarsinom
16	K	62	İyi differansiye	İyi derecede differansiye Adenokarsinom
17	K	64	Orta derecede Grade II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
18	K	57	İyi differansiye Derece I	İyi derecede differansiye Adenokarsinom
19	K	65	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
20	K	72	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
21	E	53	İyi derecede Derece I	İyi derecede differansiye Adenokarsinom
22	E	40	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
23	E	70	pT2N ₀	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
24	E	57	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
25	E	59	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
26	E	76	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
27	E	51	pT4 N ₀	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
28	E	60	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
29	E	79	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
30	E	63	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
31	E	45	Derece III	Taşlı yüzük hücreli
32	E	74	İyi derecede Derece I	İyi derecede differansiye Adenokarsinom
33	E	60	İyi derecede Derece I	İyi derecede differansiye Adenokarsinom
34	E	73	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom
35	E	50	Orta derecede Derece II	Orta derecede differansiye Adenokarsinom

♀;K: Kadın - ♂;E:Erkek

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Agaroz	(Serva, ALMANYA)
TAE (Tris –Asetik Asit-EDTA)	(Dr.Zeydanlı, TÜRKİYE)
Primer	(MWG-BIOTECH, ALMANYA)
1- Arg72Pro Primeri	F: 5'TTGCCGTCCTCAAGCAATGGATGA3' R: 5'TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC'
2- G13964C Primeri	F: 5'CTCCCCTGCTTGCCACAGGT3' R: 5'CAGTGTGCAGGGTGGCAAGT3'
Loading Dye 6X	(Dr.Zeydanlı, TÜRKİYE)
EtBr Stock Solution	(Dr.Zeydanlı, TÜRKİYE)
EZNA Tissue DNA Kits	(Omega, ALMANYA)
MgCl ₂ (25mM)	(Fisher)
dH ₂ O	
PCR Grade Su	(Dr.Zeydanlı, TÜRKİYE)
Hot Start Taq DNA Polimeraz	(Bioron, ALMANYA)
2X Üiversal Miks	(Dr.Zeydanlı, TÜRKİYE)
Etanol	(Merck, ALMANYA)
Xylene	(Merck, ALMANYA)
DNA Marker	(SEENECE, USA)
BstFNI enzim 5'CG↓CG3' 1500 units 3000 U/ml	(Sibenzyme)
3'GC↑GC5'	
BstHHI enzim 5'GCG↓C3' 2000 units 10000 U/ml	(Sibenzyme)
3'C↑GCG5'	
%99.5'lik Etanol	(Tekel)
%70'lik Etanol	(Tekel)

3.1.3 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı

%70'lik Etanol

70 ml Etanol

30 ml distile su

%99,5'luk Etanol

96ml Etanol

4ml distile su

0,5 X TAE

10X TAE 50 ml

dH₂O 450 ml

% 1'lik Agaroz Jel

Agaroz 1,15 gr

0,5X TAE 115 ml

% 2'lik Agaroz Jel

Agaroz 2,3 gr

0,5X TAE 115 ml

PCR Mix 35 test için

Complete buffer 175µl

dNTPmix 25mM 7µl

Primer 10pmol 35µl

Taq DNA Polimeraz 17.5µl

Distile su 134µl

Primerler

Son konsantrasyon 10 pmol olabilmesi için liyofilize içeriğe 400µl H₂O eklendi.

EZNA tissue DNA Kit

DNA izolasyonu için Kit protokolü tamamen uygulandı, solüsyon içerikleri değiştirilmedi.

Enzimler

1-BstFNI (3000 U/ml) 5'...CG↓CG...3'

1xSE Buffer: 33mM Tris acetate (pH:7.9) 3'...GC↑GC...5'

10mM Magnezyum asetat

66mM Potasyum asetat; 1mM DDT

2-BstHHI (10.000 U/ml) 5'...GCG↓C...3'

1xSE Buffer: 33mM Tris acetate (pH:7.9) 3'...C↑GCG...5'

10mM Magnezyum asetat

66mM Potasyum asetat; 1mM DDT

3.1.4 Kullanılan Cihazlar

Laminair Flow	(Biolab, USA)
Su banyosu	(Nüve, TÜRKİYE)
Vortex	(Boeco, ALMANYA)
Soğutmalı Santrifüj	(Boeco, ALMANYA)
Otomatik pipet	(Boeco, ALMANYA)
Elektroforez Sistemi	(CSL, İNGİLTERE)
Güç Kaynağı	(CSL, İNGİLTERE)
Görüntüleme Sistemi	(Syngene, İNGİLTERE)
Thermal Cycler Gradient	(Quanta, İNGİLTERE)
Thermal Cycler	(Primus 96 Advanced, Peqlab, ALMANYA)
pH metre	(Hanna, ALMANYA)
Hassas Terazi	(Hanna, ALMANYA)
Manyetik Karıştırıcı	(Boeco, ALMANYA)
Buzdolabı	(VESTEL, TÜRKİYE)
Dondurucu	(ARÇELİK, TÜRKİYE)

3.2 METOD

Yapılan çalışmada, kolon kanseri tanısı konmuş 35 olgunun parafine gömülü tümör doku örneklerinden EZNA doku DNA Kiti kullanılarak genomik DNA izole edildi. DNA'nın incelenebilecek düzeyde olması için PCR optimizasyonu yapıldı. Elde edilen DNA'ların p53 genine ait Arg72Pro (ekson 4) ve G13964C (intron 6) bölgeleri PCR yöntemi ile amplifiye edilerek seçilen primerlerin uygunluğu kontrol edildi. Amplikonlar %1'lik agaroz jelde kontrol edildi. Arg72Pro bölgesi polimorfizmi için BstFNI enzimi, G13964C bölgesi polimorfizmi için BstHNI enzimleri kullanılarak, enzimatik kesim yapıldı. Enzimatik kesimin sonuçları %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek transüliminatörde görüntülendi.

3.2.1 Parafine Gömülü Dokudan DNA İzolasyonu Protokolü

Parafine gömülü doku örneklerinden kesit alabilmek için mikrotomun temiz olmasına dikkat edildi. Kesit alınırken mikrotom bıçağı her kullanımda değiştirilip, alkolle temizlendi. 5 µm kalınlığında alınan 10-15 adet kesit steril ependorf tüplere konuldu. Parafine gömülü doku örneklerinden DNA izolasyonu için EZNA doku DNA hazır kit kullanıldı. İzolasyon işleminde şu basamaklar kullanıldı:

- 1- Kesitlerin bulunduğu 1,5ml'lik tüplerin içine 1000µl ksilol (parafini çözmek ve uzaklaştırmak için) eklendi. Tüp hafifçe 2-3 dk alt üst edilerek parafinin çözülmesi sağlandı. Mikrosantrifüjle 1 dk 20°C 8000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- 2- Parafinin tamamen uzaklaşması için bu işlem 3 kez tekrarlandı (son basamakta ksilol 500µl eklendi).
- 3- Yıkama basamağı için tüplerin her birine, 1000µl %99.5'lik etanol (ksilölü uzaklaştırmak için) eklendi. Tüp 2-3 dk alt üst edilerek karıştırıldı. 1 dk 20°C 8000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.

- 4- Tüplere 1000µl %70'lik etanol eklendi. Tüp 2-3 dk alt üst edilerek karıştırıldı. 1 dk 20°C 8000rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- 5- Yıkama basamağında son olarak 750µl dH₂O (etanolu uzaklaştırmak için) eklendi. Tüp 2-3 dk alt üst edilerek karıştırıldı. 1 dk 20°C 8000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- 6- 220µl Tissue Lysis Buffer (TL-doku lizisi; dokuyu parçalamak ve hücrelerin açığa çıkmasını sağlamak için) ve 30µl proteaz (proteinlerin parçalanması ve protein artıklarını elimine etmek için) eklendi. Tüp 2-3 dk alt üst edilerek karıştırıldı. Bir gece 55°C inkübasyona bırakıldı.
- 7- 220µl Blood Lysis Buffer (BL-kan lizisi) (hücreleri parçalamak için) eklendi. 10 dk 70°C inkübasyona bırakıldı.
- 8- 220µl %99.5'lik etil alkol (açığa çıkan DNA'nın toplanması için) eklendi ve spinlere döküldü. 1 dk 20°C 8000 rpm' de santrifüj edildi. Kolonlardaki süpernatant döküldü.
- 9- 650µl Wash Buffer (Etanol;DNA'nın yıkanarak temizlenmesi için) eklendi. Tüp 2-3 dk alt üst edilerek karıştırıldı. 2 dk 20°C 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Kolonlardaki süpernatant döküldü.
- 10- 500µl Wash Buffer eklendi. Tüp 2-3 dk alt üst edilerek karıştırıldı. Kolonlardaki süpernatant döküldü. 2 dk 20°C 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Kolonlardaki süpernatant döküldü
- 11- 200µl Elution Buffer (spine tutunan DNA'nın spinden düşürülmesi ve sulandırılması için) eklendi. Tüp 2-3 dk alt üst edilerek karıştırıldı. 2 dk 20°C 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Spinler atılarak kolonlar ayrıldı.

3.2.2. PCR Optimizasyonu ve PCR Amplifikasyonu

Mg iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini artırır ve çift iplikli DNA'nın T_m değerini (çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına yol açan sıcaklık derecesi) artırır, ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlar. Bu nedenle

MgCl₂'ün PCR'nın özgülüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli etkisi vardır (Temizkan ve Arda, 2004).

Bu bilgilere dayanarak MgCl₂ konsantrasyonu, annealing sıcaklığı ve primer optimizasyonu yapıldı. Arg72Pro ve G13964C primerinin optimizasyonunda MgCl₂ konsantrasyonları için denenen PCR karışım miktarları Tablo 3.2.a.b.c.'de verilmiştir.

Tablo 3.2.a 0.22mM MgCl₂ için kullanılan PCR karışımı.

Kimyasallar	Miktar
10x Buffer	25µl
MgCl ₂ 25mM	4µl x 10 = 40µl
dNTP mix 25mM	0.2µl x 10 = 2µl
Primer 10pmol	1µl x 10 = 10µl
Taq polimeraz	0.5µl x 10 = 5µl
dH ₂ O	343µl
Toplam	450µl

Tablo 3.2.b 0.27mM MgCl₂ için kullanılan PCR karışımı.

Kimyasallar	Miktar
10x Buffer	25µl
MgCl ₂ 25mM	5µl x 10 = 50µl
dNTP mix 25mM	0.2µl x 10 = 2µl
Primer 10pmol	1µl x 10 = 10µl
Taq polimeraz	0.5µl x 10 = 5µl
dH ₂ O	333µl
Toplam	450µl

Tablo 3.2.c 0.33mM MgCl₂ için kullanılan PCR karışımı.

Kimyasallar	Miktar
10x Buffer	25µl
MgCl ₂ 25mM	6µl x 10 = 60µl
dNTP mix 25mM	0.2µl x 10 = 2µl
Primer 10pmol	1µl x 10 = 10µl
Taq polimeraz	0.5µl x 10 = 5µl
Taq polimeraz	0.5µl x 10 = 5µl
dH ₂ O	323µl
Toplam	450µl

Arg72Pro ve G13964C bölgelerine ait primer optimizasyonu, annealing sıcaklıkları ve MgCl₂ konsantrasyonlarını belirlemek üzere Gradientli Termal Cycler'da (G PCR) kurulan deney düzeneği Şekil 3.1'de gösterildiği gibi

0.2ml'lik ependrof tüplerine PCR master mix ve DNA'lar konularak cihaza yerleştirilmiştir.

	Arg72Pro primer				
	57°C	58.2°C	59.2°C	60.4°C	61.1°C
4 MgCl ₂	O	O	O	O	O
5 MgCl ₂	O	O	O	O	O
6 MgCl ₂	O	O	O	O	O

	G13964C primer				
	57°C	58.2°C	59.2°C	60.4°C	61.1°C
4 MgCl ₂	O	O	O	O	O
5 MgCl ₂	O	O	O	O	O
6 MgCl ₂	O	O	O	O	O

Şekil 3.1. Arg72Pro ve G13964C bölgelerine ait primer optimizasyonu, annealing sıcaklıkları ve MgCl₂ konsantrasyonlarını belirlemek üzere Gradientli Termal Cycler'da (G PCR) kurulan deney düzeneği

Gradientli PCR cihazında belirlenen Arg72Pro ve G13964C bölgelerine ait primer optimizasyonu, annealing sıcaklıkları ve MgCl₂ konsantrasyonları çalışıldı ve bu oranların son kez optimizasyonu yapıldı. Arg72Pro için ve G13964C için yapılan son optimizasyon PCR misklerinin miktarları Tablo 3.3 ve 3.4'de ve PCR şartları Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Arg72Pro için son optimizasyon PCR miski.

Kimyasallar	Miktar
10x Buffer	5µl
MgCl ₂	0.27mM
dNTP mix	0,2µl
Primer	1µl
Taq polimeraz	0,5µl
dH ₂ O	33,3µl
DNA	5µl
Toplam	450µl

Tablo 3.4. G13964C için son optimizasyon PCR miski.

Kimyasallar	Miktar
10x Buffer	5µl
MgCl ₂	0.27mM
dNTP mix	0,2µl
Primer	0,5µl
Taq polimeraz	0,5µl
dH ₂ O	33,8µl
DNA	5µl
Toplam	450µl

Tablo 3.5. Arg72Pro ve G13964C için son optimizasyonun PCR şartları.

Basamak	Sıcaklık	Süre	Aşama
1	95 °C	5 dk	İlk denatürasyon (Initial denaturation)
2	95 °C	30 sn	Ayrılma (Denatürasyon)
3	59 °C	30 sn	Tutunma (Annealing)
4	72 °C	35 sn	Uzama (Extension)
5	72 °C	10 dk	Son Uzama (Last Extension)

İzolasyonları PCR’da kontrol edilen DNA’ların Arg72Pro (ekson 4) ve G13964C (intron 6) bölgelerine ait primerler ile amplifikasyonları için optimizasyon denemeleri gradientli PCR cihazında yapıldı. Arg72Pro (ekson 4) ve G13964C (intron 6) bölgelerine ait spesifik primer çiftleri

Arg72Pro bölgesine ait;

F:5’TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA3’,

R:5’TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC’

ve G13964C bölgesine ait ;

F:5’CTCCCCTGCTTGCCACAGGT3’,

R: 5’CAGTGTGCAGGGTGGCAAGT3’)

Primerler kullanılarak amplifikasyonları gerçekleştirildi. Amplifiye edilecek örnek sayısı kadar PCR karışımı hazırlandı. Kontaminasyon riskini en aza indirmek için hazır PCR mixleri kullanıldı. 1.5ml’lik ependorf tüpte hazırlanarak her bir örnek için 0.2ml’lik steril ependorf tüplerine 45µl olacak şekilde dağıtıldı. 5µl kalıp DNA ilave edildi. DNA’lar şartları ayarlanmış gradientli PCR cihazında amplifiye edildi. Amplifiye edilmek istenen Arg72Pro bölgesi için PCR’da kullanılan en son kimyasallar ve miktarları Tablo 3.6 ve 3.7’de, PCR çalışma şartları ise Tablo 3.8’de verimli

Tablo 3.6 Arg72Pro için PCR’da kullanılan kimyasallar ve miktarları.

Kimyasallar	Miktar (35 Test için)
10x Buffer	175µl (5x35µl)
dNTP mix	7µl (0.2x35µl)
Primer	35µl (1x35µl)
Taq polimeraz	17,5µl (0.5x35µl)
dH ₂ O	1341µl (0.5x35)
Toplam	1575.5µl

Tablo 3.7 G13964C için PCR’da kullanılan kimyasallar ve miktarları.

Kimyasallar	Miktar (35 test için)
10x Buffer	175µl (5x35µl)
dNTP mix	7µl (0.2x35µl)
Primer	17,5µl (0.5x35µl)
Taq polimeraz	17,5µl (0.5x35µl)
dH ₂ O	1358µl
Toplam	1575µl

Tablo 3.8 Arg72Pro ve G13964C için uygulanan PCR şartları.

Basamak	Sıcaklık	Süre	Aşama
1	95 °C	5 dk	İlk denatürasyon
2	95 °C	30 sn	Denatürasyon
3	59 °C	30 sn	Tutunma
4	72 °C	35 sn	Uzama
5	72 °C	10 dk	Son Uzama

PCR sonunda amplifikasyon ürünlerinin kontrol edilmesi için % 1’lik agaroz jel hazırlanıp, etidyum bromür içeren agaroz jelde 0,5xTAE tampon solüsyonu içinde 100 voltta 30 dk yürütülerek transüliminatörde görüntülendi.

Agaroz jelin hazırlanışı;

100 ml’lik erlende, 115ml 0.5xTAE içine 1.15g agaroz eklendi ve mikrodalga fırında kaynatıldı. Beher içine EtBr eklendi ve jel setine dökülerek tarak yerleştirildi. Jelin donmasından sonra içinde 0.5xTAE bulunan elektroforez tankına koyuldu. Tarak çıkarıldıktan sonra kuyulara sırasıyla amplifikasyon ürünüyle birlikte brom fenol blue yüklendi. Ayrıca değerlendirilmenin güvenilir olması için ilk ve son kuyucuklara Molecular Weight Marker DNA 100bp

Ladder (1200-1100-1000-900-800-700-600-500-400-300-200100) özelliğindeki marker yüklendi. %1'lik agaroz jelde 130 voltta 25 dk yürütüldü. Sonuçlar UV transillimünatörde değerlendirildi.

3.2.3. Enzimatik Kesim

PCR ürünleri agaroz jelde kontrol edildikten sonra p53 mutasyonu Arg72Pro polimorfizmi ve G13964C intronik varyant polimorfizimini saptamak için amplifikasyon ürünlerine Arg72Pro için BstFNI enzimi ile G13964C için BstHHI enzimi ile enzimatik kesim yapıldı.

1-BstFNI (3000 U/ml)

5'...CG↓CG...3'

3'...GC↑GC...5'

2-BstHHI (10.000 U/ml)

5'...GCG↓C...3'

3'...C↑GCG...5'

Çalışmamızda Arg72Pro amplifikasyon ürünleri BstFNI ile G13964C amplifikasyon ürünleri BstHHI enzimleri ile kesimi için, 1µl enzim, 1µl 10x Buffer, 8.5µl PCR amplifikasyon ürünü 0.2ml'lik ependorf tüplerine koyuldu ve 16 saat 55°C inkübasyona bırakıldı. P53 mutasyonu Arg72Pro ve G13964C polimorfizmini saptamak için enzimatik kesim uygulamasında kullanılan kimyasallar Tablo 3.9 ve 3.10'da verilmiştir.

16 saat inkübasyondan sonra örnekler, %2'lik agaroz jele yüklenerek, içinde 0,5xTAE buffer bulunan agaroz jel elektroforez tankına konuldu. Yükleme işlemi sırasında, kuyulara 13µl enzim kesim ürünüyle birlikte bromfenol blue eklenerek yükleme yapıldı. Son kuyucuğa Molecular Weight Marker DNA 100bp Ladder (1200-1100-1000-900-800-700-600-500-400-300-200100) özelliğindeki marker yüklendi. Arg72Pro için 120voltta 30 dakika, G13964C için 140 voltta 20 dakika yürütüldü. Sonuçlar UV transillimünatörde değerlendirildi.

Tablo 3.9. Arg72Pro polimorfizmi için enzimatik kesimde kullanılan kimyasalların miktarları.

BstFNI enzimi	1 μ lx3=3 μ l
10xBuffer	1 μ lx3=3 μ l
PCR ürünü	8.5 μ lx3=31.5 μ l

Tablo 3.10.G13964C polimorfizmi için enzimatik kesimde kullanılan kimyasalların miktarları.

BstHHI enzimi	1 μ lx3=3 μ l
10xBuffer	1 μ lx3=3 μ l
PCR ürünü	8.5 μ lx3=31.5 μ l

3.2.4. Kullanılan İstatistik Metodu

t-testi; değişkenin toplumda normal dağıldığı, örnek hacminin $n < 30$ olduğu, örnek hacimleri $n_1 < 30$ ya da $n_2 < 30$ olduğu iki örnekte, örnek hacminin $n > 30$ olduğu fakat toplum standart sapmasının bilinmediği durumlarda toplum ortalama ve oranlarına ilişkin hipotezlerin test edilmesinde yararlanılan bir önemlilik testidir. Bu teste Student *t testi* de denilmektedir.

t-testi ayrıca, bir grup üzerinden iki veri seti elde edildiğinde eşleştirilmiş denemelere ilişkin hipotezleri test etmekte de yararlanılmaktadır.

t dağılımının kritik değerleri serbestlik derecesi (sd) adını verdiğimiz bir değere bağlı olarak değişiklikler göstermektedir.

t-testi az sayıda birimli deneme sonuçlarına uygulanan yaygın kullanımı olan bir testtir (Özdamar, 1997).

4.BULGULAR

4.1 DNA İzolasyonu Sonuçları

Parafine gömülü kolon tümör doku örneklerinden öncelikle parafin uzaklaştırıldı. DNA izolasyonu için EZNA Tissue DNA hazır kiti kullanıldı. İzole edilen DNA'nın varlığı PCR ve agaroz jel elektroferez ile tespit edildi. DNA izolasyonuna ilişkin sonuçlar, amplifikasyon ve enzim kesim sonuçlarıyla beraber Tablo 4.2'de verilmiştir.

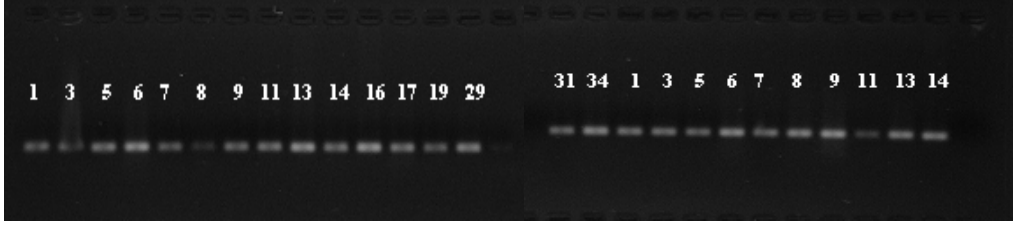
Tablo 4.2. DNA izolasyonu, amplifikasyon ve enzim kesimi sonuçları.

Olgu No	DNA İzolasyon Son.	Arg72Pro Amplifikasyonu	G13964C Amplifikasyonu	Arg72Pro genotipleri	G13964C genotipleri
1	+	+	+	Arg/Arg	GC
2	+	+	+	-	G/G
3	+	+	+	-	G/G
4	+	+	+	Arg/Pro	GC
5	+	+	+	Arg/Arg	G/G
6	+	+	+	Arg/Pro	GC
7	+	+	+	Arg/Pro	GC
8	+	+	+	Arg/Pro	GC
9	+	+	+	Arg/Arg	GC
10	+	+	+	Arg/Arg	GC
11	+	+	+	Arg/Pro	GC
12	+	+	+	Arg/Arg	GC
13	+	+	+	Arg/Arg	GC
14	+	+	+	Arg/Pro	GC
15	+	+	+	Arg/Arg	GC
16	+	+	+	Arg/Arg	GC
17	+	+	+	-	-
18	+	+	+	Arg/Arg	GC
19	+	+	+	-	G/G
20	+	+	+	Arg/Arg	GC
21	+	+	+	Arg/Pro	GC
22	+	+	+	Arg/Pro	C/C
23	+	+	+	Arg/Arg	GC
24	+	+	+	Pro/Pro	G/G
25	+	+	+	Arg/Arg	-
26	+	+	+	Arg/Arg	G/G
27	+	+	+	Arg/Pro	GC
28	+	+	+	Arg/Pro	GC
29	+	+	+	-	G/G
30	+	+	+	Arg/Pro	C/C
31	+	+	+	Pro/Pro	GC
32	+	+	+	-	-
33	+	+	+	Arg/Arg	GC
34	+	+	+	-	-
35	+	+	+	-	-

Dokulardan; parafinden uzaklaştırma (deparafinizasyon) ve DNA izolasyonu için öncelikle 2, 10, 12, 15, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 32, 33, 35 nolu örnekler çalışılmıştır. İlk önce bu olguların çalışılmasının nedeni; dokulardan DNA izole edilememe ihtimaline karşı, tüm dokuları harcamamak için, deneme amaçlı olarak dokuların yarısı izolasyon için kullanılmıştır. Daha sonra 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 29, 31, 34 no'lu örneklerde DNA izolasyonunu doğrulamak için ikinci bir izolasyon daha yapıldı. İkinci grup DNA izolasyonu da net sonuçlar verdiği için, izole edilen DNA örnekleri ile çalışmaya devam edildi. 2, 12, 15, 20, 21, 24, 32 nolu örneklerde DNA çok yoğun görüldü. Bir gece inkübasyondan sonra, 10 nolu örneğin bulunduğu tüpün kapağı açılmış olduğu için, bufferin uçtuğu farkedilip yeniden lizis buffer eklendi, fakat sonuçta DNA izolasyonu gerçekleşti. DNA izolasyon kontrolü için glukoz-6-fosfatdehidrojenaz kullanılmıştır. İzole edilen DNA'ların jel elektroferez görüntüleri Resim 4.1 ve Resim 4.2'de verilmiştir.



Resim 4.1. İlk denenen örneklerde izolasyon sonuçları. G6PDHG: Glukoz-6-fosfatdehidrojenaz kontrol.

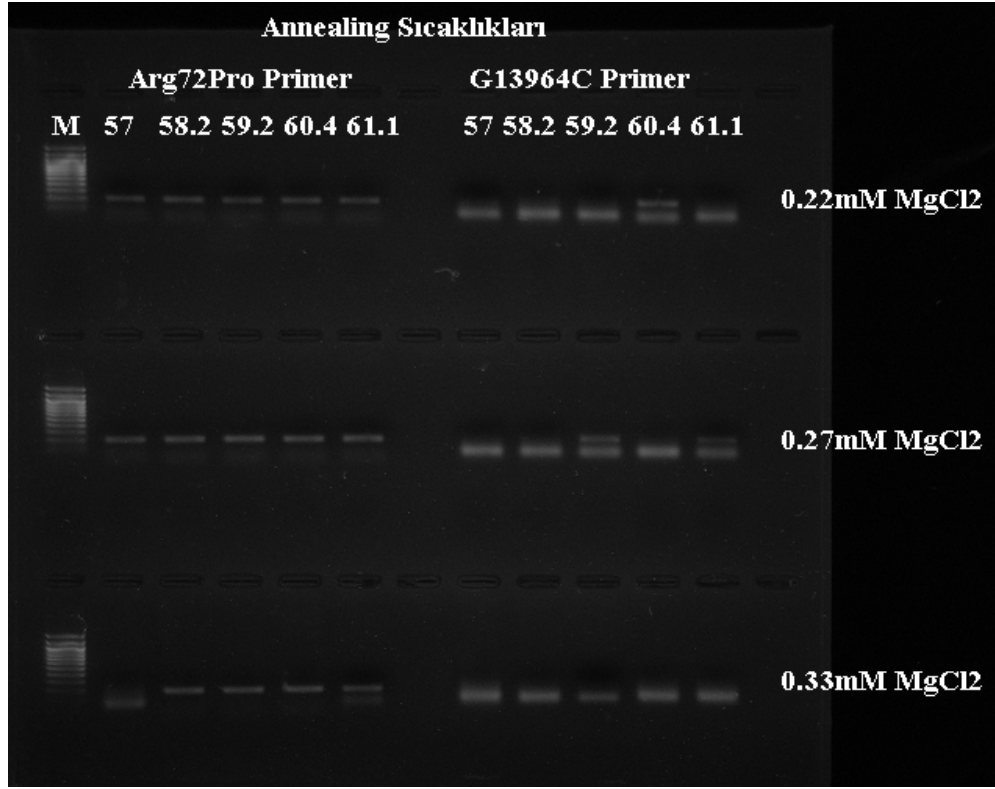


Resim 4.2. İkinci grup DNA izolasyonu sonuçları.

4.2 PCR Optimizasyonu ve Sonucu

p53 mutasyonunu Arg72Pro ve G13964C polimorfizmlerini tespit etmek için; primer optimizasyonu, MgCl₂ konsantrasyonu ve annealing sıcaklıklarının aynı anda belirlenebildiği Gradientli PCR cihazı kullanıldı. Buna göre; MgCl₂ konsantrasyonlarının deneme amaçlı 0.22mM, 0.27mM, 0.33mM olacak şekilde miktarları belirlendi. Daha sonraki çalışmalar için uygun annealing sıcaklığını belirlemek üzere, denenen annealing sıcaklık aralıkları 57°C, 58.2°C, 59.2°C, 60.4°C, 61.1°C'dir. Optimizasyonda denenen primer miktarları, annealing sıcaklıkları ve MgCl₂ konsantrasyonlarının sonuçları, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de verilmiştir.

Resim 4.3'ün sol tarafında Arg72Pro için denenen annealing sıcaklıkları, MgCl₂ konsantrasyonları ve primer optimizasyonu, sağ tarafında ise G13964C için denenen annealing sıcaklıkları, MgCl₂ konsantrasyonları ve primer optimizasyonu PCR sonrası jelde görüntülenmiştir. Her iki gen bölgesine ait primer dizileri materyal ve metotda verilmiştir.



Resim 4.3. Optimizasyon sonuçlarının elektroferozdeki band görüntüsü.

Tablo 4.3. Arg72Pro primeri için birinci örnek optimizasyon deneme sonuçları.

Annealing Sıcaklığı	0.22mM MgCl ₂	0.27mM MgCl ₂	0.33mM MgCl ₂
57 °C	+	+	- *
58.2 °C	+	+	+
59.2 °C	+	+	+
60.4 °C	+	+	+
61.1 °C	+	+	+

(*) Primer non-spesifik olarak bağlandığı için olumlu sonuç vermedi.

Tablo 4.4. G13964C primeri için birinci örnek optimizasyon deneme sonuçları.

Annealing °C	0.22mM MgCl ₂	0.27mM MgCl ₂	0.33mM MgCl ₂
57 °C	+	+	+
58.2 °C	+	+	+
59.2 °C	+	Çift band nonspesifik*	+
60.4 °C	Çift band nonspesifik*	+	+
61.1 °C	+	Çift band nonspesifik*	+

(*)Sonucun çift band nonspesifik olması; deneme amaçlı kullanılan 10 pmol primerin fazla gelmesinden kaynaklanmaktadır. G13964C intronik varyant optimizasyonunda primer miktarı bu nedenle 5 pmol olarak belirlendi.

Gradientli PCR'da yapılan optimizasyon denemesinde; Arg72Pro ve G13964C bölgelerindeki polimorfizmleri güvenilir bir şekilde saptayabilmek için en verimli optimizasyon koşulunun; MgCl₂ konsantrasyonu 0.27mM olarak çalışılması, annealing sıcaklığınının 59.2°C olması ve G13964C intronik varyant için primer miktarı nonspesifik çift bandlar verdiği için;1 µl'den 0.5 µl'ye düşürülmesine karar verildi.

4.3 PCR Amplifikasyonu ve Enzimatik Kesim Sonuçları

İzolasyondan sonra elde edilen DNA'ların p53 mutasyonunu belirlemek üzere Arg72Pro ve G13964C polimorfizm bölgeleri için seçilen primer çiftleri ile belirlenen uygun PCR şartlarında amplifikasyonları gerçekleştirildi. Primerlerin çalışıp çalışmadığı kontrol edildi.

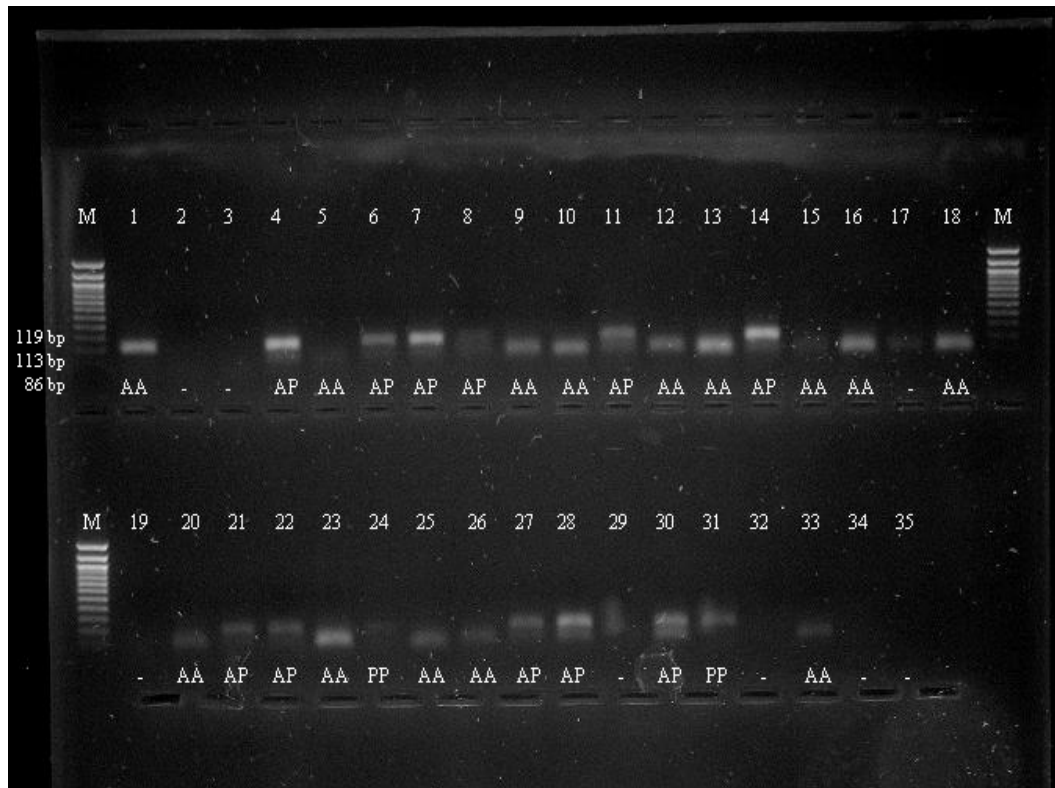
p53 mutasyonu için Arg72Pro polimorfizmini saptamak amacıyla PCR sonucunda elde edilen amplikonlara ilk önce restriksiyon enzimi ile enzim kesimi uygulandı. Enzim kesim sonuçları Tablo 3.2' de verilmiştir.

p53 mutasyonu için Arg72Pro amplifikasyon ürünleri 4. ekson üzerinde yer alan 72. kodonda 5'...CG↓CG...3', 3'...GC↑GC...5' tanıma sekansı bulunan BstFNI restriksiyon enzimi ile muamele edildi (Langerød et al. 2002). İkinci işlem olarak G13964C intronik varyantını belirlemek üzere; intron 6' da yer alan 13964. nükleotitdeki GC polimorfizmi için 5'...GCG↓C...3', 3'...C↑GCG...5' tanıma sekansı bulunan BstHII restriksiyon enzimi ile enzimatik kesimi yapıldı (Buyru et al. 2005).

Çalışmamızda p53 mutasyonu için Arg72Pro polimorfizmini saptamak amacıyla PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerine BstFNI restriksiyon enzimi ile enzim kesimi uygulandı. Çalışmamızda Arg72Pro bölgesi için uygulanan enzim kesimi sonucunda 2, 3, 17, 19, 29, 32, 34 ve 35 nolu olgulara ait örneklerde DNA izole edilmesine rağmen enzim kesimi gerçekleşmemiştir. Enzim kesimi gerçekleşmiş olan bölgelerde ise; Pro homozigotu 199 bp uzunluğunda tek DNA

bandı gösterirken, Arg homozigotu 113 bp ve 86 bp uzunluğunda çift DNA bandı gösterdi ve Arg/Pro heterozigotu da her iki allelin kombinasyonu olan üç bant (119, 113 ve 86 bp) halinde kesim gösterdi.

Enzim kesim görüntüleri literatürle uyumludur (Zhu et al. 2005). P53 mutasyonu için Arg72Pro polimorfizmini belirlemek amacıyla, PCR ürünlerine enzimi kullanılarak uygulanan enzim kesimi görüntüleri Resim 4.4’de verilmiştir.

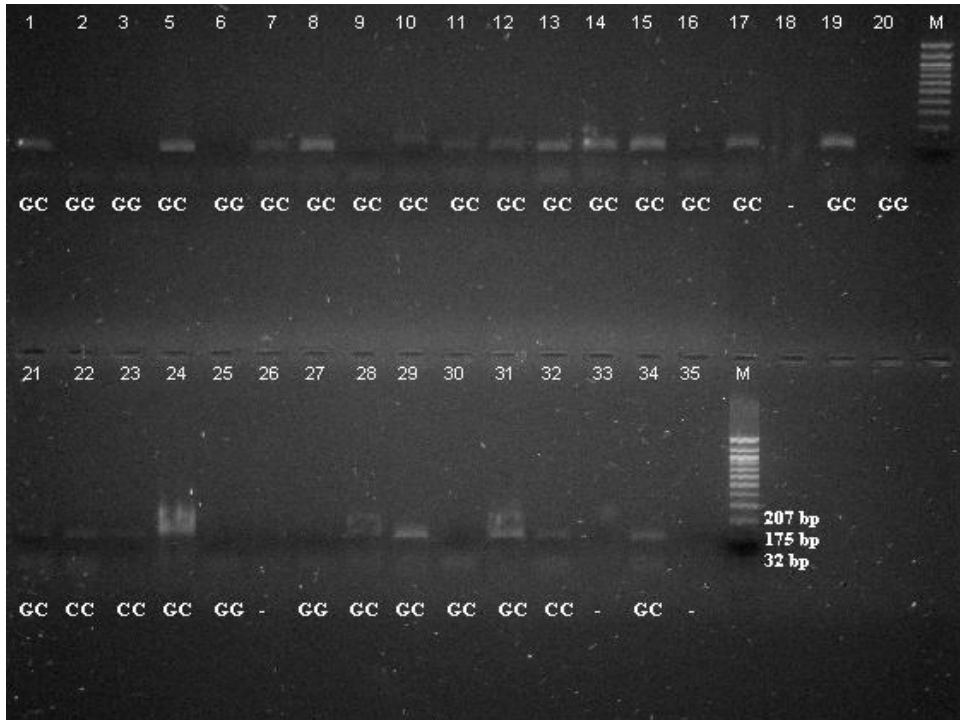


Resim 4.4. Arg72Pro bölgesinin enzim kesim sonuçlarının jel elektroferezde görüntüleri. Molecular Weight Marker DNA 100bp Ladder (1200-1100-1000-900-800-700-600-500-400-300-200100) AA:Arg/Arg homozigot, AP:Arg/Pro Heterozigot, PP:Pro/Pro Homozigot.

Çalışmamızda p53 mutasyonu için G13964C intron 6 polimorfizmini saptamak amacıyla PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerine BstHFI restriksiyon enzimi ile enzim kesimi uygulandı. Enzim kesim sonuçları bölgesi için uygulanan enzim kesimi sonucunda 17, 25, 32, 34, 35 nolu olgulara ait

örneklerde DNA izole edilmiş olmasına rağmen enzim kesimi gerçekleştirilememiştir. Enzim kesim sonuçları Tablo 3.2’de verilmiştir.

P53 mutasyonu için G13964C intronik bölge genotipleri için; CC homozigotu 175 bp tek DNA bandı gösterirken, GG homozigotu 175 ve 32 bp uzunluğunda çift DNA bandı gösterdi ve GC heterozigotu da her iki allelin kombinasyonu olan üç bant (207, 175 ve 32 bp) halinde kesim gösterdi. Enzim kesim görüntüleri literatürle uyumludur (Fiszler-Maliszewska 2003). P53 mutasyonu için G13964C intronik varyant polimorfizmini belirlemek amacıyla, PCR ürünlerine BstHII enzimi kullanılarak uygulanan enzim kesimi görüntüleri Resim 4.5’de verilmiştir.



Resim 4.5. G13964C bölgesinin enzim kesim sonuçlarının jel elektroferezde görüntüleri Molecular Weight Marker DNA 100bp Ladder (1200-1100-1000-900-800-700-600-500-400-300-200100) GG:G/G homozigot, GC:GC Heterozigot, CC: C/C Homozigot.

4.3.1. Yaş ve Cinsiyet Karşılaştırması

Çalışmada kolon kanseri tanısı konmuş 20 kadın ve 15 erkek olguya ait toplam 35 doku kullanılmıştır. Bu çalışmaya katılan olguların cinsiyetlere göre yaş ortalaması ve standart hatası kadınlar için (65.95 ± 2.76), erkekler için (61.67 ± 3.07) olarak ve olguların genel yaş ortalaması (64.11 ± 2.06) bulunmuştur. Yapılan *t-testinin* sonucunda cinsiyetler arasında yaş bakımından fark olmadığı tespit edilmiştir ($p=0.307 > 0.05$). Bu istatistiksel sonuca göre farklı cinsiyetlerde aynı yaş grubunda çalışılmıştır.

4.3.2. Cinsiyetlerin Arg72Pro ve G13964C Mutasyon Bulguları

P53 mutasyonu Arg72Pro polimorfizm bölgesinin enzim kesimi sonucu Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro genotiplerinde olmak üzere üç farklı sonuca göre kadınlar arasında gözlenen olgu sayısı 7 Arg/Arg homozigot, 8 Arg/Pro heterozigot, 1 Pro/Pro homozigot ve erkekler arasında ise 7 Arg/Arg homozigot, 3 Arg/Pro heterozigot, 1 Pro/Pro homozigot oranında tespit edilmiştir. Arg72Pro polimorfizmi için enzim kesimi uygulamasında 8 örnekte enzim kesimi gerçekleşmemiştir. Buna göre Arg72Pro genotip oranları ise kadınlar için Arg/Arg homozigot %43.8, Arg/Pro heterozigot %50.0, Pro/Pro homozigot %6.3 ve erkekler için Arg/Arg homozigot %63.6, Arg/Pro heterozigot %27.3, Pro/Pro homozigot %9.1 olarak bulunmuştur. Her iki cinsiyete ait oranlar ise Arg/Arg homozigot %51.9, Arg/Pro heterozigot %40.7 ve Pro/Pro homozigot %7.4 olarak tespit edilmiştir. P53 genine ait Arg72Pro polimorfizminin genotiplerine ait istatistiki değerlendirmede *t-testi* kullanılmıştır ve sonuçlar Tablo 4.5'de verilmiştir. Yapılan *t-testinin* sonucunda cinsiyetler arasında Arg72Pro polimorfizmi bakımından fark yoktur ($p=0.498 > 0.05$).

Tablo 4.5. Arg72Pro için cinsiyetlerin Arg/Arg homozigot, Arg/Pro heterozigot ve Pro/Pro homozigot genotip yüzdeleri

			Arg72Pro			Toplam
			A	AP	PP	
CINSİYET	Kadın	Sayı	7	8	1	16
		Cinsiyet içindeki %	43,8%	50,0%	6,3%	100,0%
		Arg72Pro içindeki %	50,0%	72,7%	50,0%	59,3%
		Toplam %'si	25,9%	29,6%	3,7%	59,3%
	Erkek	Sayı	7	3	1	11
		Cinsiyet içindeki %	63,6%	27,3%	9,1%	100,0%
		Arg72Pro içindeki %	50,0%	27,3%	50,0%	40,7%
		Toplam %'si	25,9%	11,1%	3,7%	40,7%
Toplam	Sayı	14	11	2	27	
	Cinsiyet içindeki %	51,9%	40,7%	7,4%	100,0%	
	Arg72Pro içindeki %	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	Toplam %'si %	51,9%	40,7%	7,4%	100,0%	

P53 genine ait G13964C intronik varyant bölgenin enzim kesim sonucunda GG homozigot, GC heterozigot, CC homozigot genotipleri olmak üzere 3 farklı sonuç elde edilmiştir. Buna göre kadınlar arasında gözlenen olgu sayısı 4 GG homozigot, 12 GC heterozigot ve 1 CC homozigot, erkekler arasında gözlenen olgu sayısı 3 GG homozigot, 9 GC heterozigot ve 1 CC homozigot tespit edilmiştir. G13964C polimorfizmi için enzim kesimi uygulamasında 5 örnekte enzim kesimi gerçekleşmemiştir. Bu sonuçlara göre, cinsiyetlere göre G13964C intronik varyantında yapılan T-testi istatistiksel sonuçları kadınlar için %23.5 GG homozigot, %70.6 GC heterozigot, %5.9 CC homozigot ve erkekler için bu genotip oranları %23.1 GG homozigot, %69.2 GC heterozigot, %7.7 CC homozigot olarak tespit edilmiştir. Cinsiyetlere ait toplam oranlar ise %23.1 GG, %70.0 GC, %6.7 CC olarak tespit edilmiştir. Cinsiyetlerin p53 mutasyonu için G13964C intronik varyant polimorfizmi üzerine hesaplanan yüzdeler Tablo 4.6'de verilmiştir. Yapılan *t-testinin* sonucunda cinsiyetler arasında G13964C intronik varyant polimorfizmi bakımından fark yoktur ($p=0.981>0.05$).

Tablo 4.6. G13964C için cinsiyetler arasında GG, GC ve CC genotip yüzdeleri.

			G13964C			Toplam
			GG	GC	CC	
CINSİYET	Kadın	Sayı	4	12	1	17
		Cinsiyet içindeki %	23,5%	70,6%	5,9%	100,0%
		G13964C içindeki %	57,1%	57,1%	50,0%	56,7%
		Toplam %'si	13,3%	40,0%	3,3%	56,7%
Erkek	Erkek	Sayı	3	9	1	13
		Cinsiyet içindeki %	23,1%	69,2%	7,7%	100,0%
		G13964C içindeki %	42,9%	42,9%	50,0%	43,3%
		Toplam %'si	10,0%	30,0%	3,3%	43,3%
Toplam	Toplam	Sayı	7	21	2	30
		Cinsiyet içindeki %	23,3%	70,0%	6,7%	100,0%
		G13964C içindeki %	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		Toplam %'si	23,3%	70,0%	6,7%	100,0%

4.3.3.Cinsiyet ve Tanı Bulguları

Kolon kanserli olgularda iyi differansiye adenokarsinom, orta derecede differansiye adenokarsinom ve bağırsakta karsinomatöz tutulum, taşlı yüzük hücreli olmak üzere üç farklı tanı grubu bulunmaktadır. İyi differansiye adenokarsinom tanısı için *iyi*, orta differansiye adenokarsinom tanısı için *orta* ve bağırsakta karsinomatöz tutulum, taşlı yüzük hücreli tanılarını için *kötü* olmak üzere 3 farklı tanı grubu oluşturulmuştur. Bu sınıflandırmaya göre; kadınlarda iyi, orta, kötü tanılarına ait doku örnekleri bulunurken erkeklerde ise iyi ve orta tanılarına ait doku örnekleri bulunmaktadır. Kadınlarda 6 iyi, 12 orta ve 2 kötü tanıli bulunurken erkeklerde 2 iyi ve 13 orta tanıli olgu bulunmaktadır. Erkeklerde kötü tanıli doku örneği elimizde bulunmamaktadır. Cinsiyete göre gözlenen tanı değerlerinin kadınlardaki yüzdeleri %30.0 iyi, %60.0 orta, %10.0 kötü ve erkekler de gözlenen tanıların yüzdeleri %13.3 iyi, %86.7 orta olarak hesaplanmıştır. Her iki cinsiyetin toplamını alarak hesaplanan tanı yüzdeleri %22.9 iyi, %71.4 orta, %5.7 kötü olarak tespit edilmiştir. t-testi ile hesaplanan, cinsiyetin kolon kanserli üç farklı tanı grubundaki olgular üzerine yüzdeleri Tablo 4.7'de verilmiştir. Yapılan *t-testinin* sonucunda cinsiyetler arasında tanı bakımından fark olmadığı tespit edilmiştir ($p=0.183>0.05$).

Tablo 4.7. Cinsiyetler arasında konulan tanıların yüzdeleri.

			TANI			Toplam
			İyi	Orta	Kötü	
CINSİYET	Kadın	Sayı	6	12	2	20
		Cinsiyet içindeki %	30,0%	60,0%	10,0%	100,0%
		Tanıdaki %	75,0%	48,0%	100,0%	57,1%
		Toplam %'si	17,1%	34,3%	5,7%	57,1%
Erkek	Erkek	Sayı	2	13		15
		Cinsiyet içindeki %	13,3%	86,7%		100,0%
		Tanıdaki %	25,0%	52,0%		42,9%
		Toplam %'si	5,7%	37,1%		42,9%
Toplam	Toplam	Sayı	8	25	2	35
		Cinsiyet içindeki %	22,9%	71,4%	5,7%	100,0%
		Tanıdaki %	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		Toplam %'si	22,9%	71,4%	5,7%	100,0%

4.3.4.Yaş Gruplarının Arg72Pro ve G13964C Mutasyon Bulguları

Çalışılan Arg72Pro ve G13964C bölgelerinin kadınlarda yaş ortalaması (65.95±2.76) erkeklerde yaş ortalaması (61.67±3.07) olduğundan, yaş gruplaması 60 ve altı ile 61 ve üzeri şeklinde 2 farklı yaş aralığı belirlenmiştir. Çalışılan Arg72Pro bölgesinin genotip sonuçlarına göre, 60 ve altındaki yaş aralığında 7 Arg/Arg homozigot, 5 Arg/Pro heterozigot, 1 Pro/Pro homozigot, 61 ve üzerindeki yaş aralığında 7 Arg/Arg homozigot, 6 Arg/Pro heterozigot ve 1 Pro/Pro homozigot olgu vardır. Ar72Pro polimorfizmi için enzim kesimi uygulamasında 8 örnekte enzim kesimi gerçekleşmemiştir. Bu sonuçlara göre, 60 ve altı yaş grubunda %53.8 oranında Arg/Arg homozigot, %38.5 oranında Arg/Pro heterozigot, %7.7 oranında Pro/Pro homozigot genotip oranları t-testine göre hesaplanmıştır. 61 ve üzeri yaş grubunda %50.0 oranında Arg/Arg homozigot genotip, %42.9 oranında Arg/Pro heterozigot genotip, %7.1 oranında Pro/Pro homozigot genotip elde edilmiştir. Cinsiyet ayrımı yapmadan genotip oranları ise %51.9 Arg/Arg homozigot, %40.7 Arg/Pro heterozigot, %7.4 Pro/Pro homozigot şeklindedir. Belirlenen yaş grupları arasında Arg72Pro polimorfizm yüzdeleri Tablo 4.8'da verilmiştir. Yapılan *t-testinin* sonucunda yaş grupları

arasında Arg72Pro polimorfizm bakımından fark olmadığı tespit edilmiştir ($p=0.973>0.05$).

G13964C bölgesinin genotip sonuçlarına göre, 60 ve altındaki yaş aralığında 3 GG homozigot, 11 GC heterozigot ve 1 CC homozigot, 61 ve üzerindeki yaş aralığında 4 GG homozigot, 10 GC heterozigot ve 1 CC homozigot olgu bulunmaktadır. G13964C polimorfizmi için enzim kesimi uygulamasında 5 örnekte enzim kesimi gerçekleşmemiştir. Bu sonuçlara göre, 60 ve altı yaş grubunda %20.0 oranında GG homozigot genotip, %73.3 oranında GC heterozigot genotip, %6.7 oranında CC homozigot genotip, 61 ve üzeri yaş grubunda %6.7 oranında GG homozigot genotip, %66.7 oranında GC heterozigot genotip, %6.7 oranında CC homozigot genotip elde edilmiştir. Cinsiyet ayrımı yapmadan genotip oranları ise %23.3 GG homozigot, %70.0 GC heterozigot, %6.7 CC homozigot şeklindedir. Belirlenen yaş grupları arasında p53 mutasyonu saptamak için G13964C intronik varyant polimorfizm yüzdeleri Tablo 4.9'da verilmiştir. Yapılan *t-testinin* sonucunda yaş grupları arasında G13964C intronik varyant polimorfizm bakımından fark olmadığı tespit edilmiştir ($p=0.909>0.05$).

Tablo 4.8. Yaş grupları arasında Arg72Pro bölgesi üzerine yüzdeleri.

		Arg72Pro			Toplam	
		AA	AP	PP		
YAS_GRUB	60 ve altı	Sayı	7	5	1	13
		Yaş grup. içindeki %	53,8%	38,5%	7,7%	100,0%
		Arg72Pro içindeki %	50,0%	45,5%	50,0%	48,1%
		Toplam %'si	25,9%	18,5%	3,7%	48,1%
	61 ve üzeri	Sayı	7	6	1	14
		Arg72Pro içindeki %	50,0%	42,9%	7,1%	100,0%
			50,0%	54,5%	50,0%	51,9%
		Toplam %'si	25,9%	22,2%	3,7%	51,9%
Toplam		Sayı	14	11	2	27
		Yaş grup. içindeki %	51,9%	40,7%	7,4%	100,0%
		Arg72Pro içindeki %	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		Toplam %'si	51,9%	40,7%	7,4%	100,0%

Tablo 4.9. G13964C bölgesinin yaş açısından değerlendirilen yüzdeleri.

		G13964C			Toplam
		GG	GC	CC	
YAS_GRUB 60 ve altı	Sayı	3	11	1	15
	Yaş grup. İçindeki	20,0%	73,3%	6,7%	100,0%
	G13964C içindeki %	42,9%	52,4%	50,0%	50,0%
	Toplam %'si	10,0%	36,7%	3,3%	50,0%
61 ve üzeri	Sayı	4	10	1	15
	Yaş grup. İçindeki %	26,7%	66,7%	6,7%	100,0%
	G13964C içindeki %	57,1%	47,6%	50,0%	50,0%
	Toplam %'si	13,3%	33,3%	3,3%	50,0%
Toplam	Sayı	7	21	2	30
	Yaş grup. İçindeki %	23,3%	70,0%	6,7%	100,0%
	G13964C içindeki %	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	Toplam %	23,3%	70,0%	6,7%	100,0%

4.3.5. Yaş Grupları ve Tanı

Tanıların değerlendirmesinde iyi differansiye adenokarsinom tanısını iyi, orta differansiye adenokarsinom tanısını orta ve bağırsakta karsinomatöz tutulum, taşlı yüzük hücreli tanılarını kötü olmak üzere 3 farklı tanı olarak ayrılmıştır. Çalışılan kolon kanserli olguların 60 ve altındaki yaş aralığında 4 iyi, 11 orta, 1 kötü ve 61 ve üzeri yaş aralığında 4 iyi, 14 orta, 1 kötü tanılı olgu bulunmaktadır. 60 ve altı yaş aralığındaki tanıların yüzdeleri %25.0 iyi, %68.8 orta, %6.3 kötü, 61 ve üzeri yaş aralığındaki tanıların yüzdeleri ise %21.1 iyi, %73.7 orta, %5.3 kötü olarak belirlenmiştir. Her iki yaş grubunun tanıya göre hesaplanan istatistikî sonuçları ise %22.9 iyi, %71.4 orta, %5.7 kötü tanılı olgular bulunmaktadır. Yapılan *t-testinin* sonucunda yaş grupları arasında tanı bakımından fark olmadığı tespit edilmiştir ($p=0.950>0.05$). Belirlenen yaş grupları ile üç farklı tanı grubundaki kolon kanserli olguların *t-testine* göre yapılan istatistikî değerlendirme sonuçları Tablo 4.10'de verilmiştir.

Tablo 4.10. Yaş aralıklarının çalışılan olgularda tanı yüzdeleri.

		TANI			Toplam
		İyi	Orta	Kötü	
YAS_GRUB 60 ve altı	Sayı	4	11	1	16
	Yaş grup. İçindeki %	25,0%	68,8%	6,3%	100,0%
	Tanı içindeki %	50,0%	44,0%	50,0%	45,7%
	Toplam %'si	11,4%	31,4%	2,9%	45,7%
61 ve üzeri	Sayı	4	14	1	19
	Yaş grup. İçindeki %	21,1%	73,7%	5,3%	100,0%
	Tanı içindeki %	50,0%	56,0%	50,0%	54,3%
	Toplam %'si	11,4%	40,0%	2,9%	54,3%
Toplam	Sayı	8	25	2	35
	Yaş grup içindeki %	22,9%	71,4%	5,7%	100,0%
	Tanı içindeki %	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	Toplam %'si	22,9%	71,4%	5,7%	100,0%

4.3.6. Tanıya Göre Arg72Pro ve G13964C Mutasyon Bulguları

İyi tanıli olgularda 3 Arg/Arg homozigot, 4 Arg/Pro heterozigot, orta tanıli olgularda 10 Arg/Arg homozigot, 6 Arg/Pro heterozigot, 2 Pro/Pro homozigot, kötü tanıli olgularda 1 Arg/Arg homozigot, 1 Arg/Pro heterozigot olgu sayısı bulunmaktadır. Ar72Pro polimorfizmi için enzim kesimi uygulamasında 8 örnekte enzim kesimi gerçekleşmemiştir. Buna sonuçlara göre, iyi tanıli olgularda Arg72Pro genotiplerinin yüzdeleri, %42.9 Arg/Arg homozigot, %57.1 Arg/Pro heterozigot, orta tanıli olgularda %55.6 Arg/Arg homozigot, %33.3 Arg/Pro heterozigot, %11.1 Pro/Pro homozigot, kötü tanıli olgularda %50.0 Arg/Arg homozigot, %50.0 Arg/Pro heterozigot olarak tespit edilmiştir. Tüm kolon kanserli olgularda Arg72Pro polimorfizm sonuçları %51.9 Arg/Arg homozigot, %40.7 Arg/Pro heterozigot, %7.4 Pro/Pro homozigot genotipleri bulunmuştur. P53 mutasyonu saptamak için Arg72Pro polimorfizmde iyi tanıli olgularda Pro/Pro homozigotu ve kötü tanıli olgularda Pro/Pro homozigotu saptanmamıştır. Yapılan *t-testinin* tanılar arasında Arg72Pro polimorfizmi bakımından fark olmadığı tespit edilmiştir ($p=0.753>0.05$). Tanıya göre, Arg72Pro polimorfizmini veren Arg/Arg homozigot, Arg/Pro heterozigot, Pro/Pro homozigot genotip yüzdeleri Tablo 4.11'de verilmiştir.

İyi tanıli olgularda 1 GG homozigot, 6 GC heterozigot, 1 CC homozigot, orta tanıli olgularda 6 GG homozigot, 13 GC heterozigot, 1 GG homozigot, kötü tanıli olgularda 2 GC heterozigot olgu sayısı bulunmaktadır. G13964C polimorfizmi için enzim kesimi uygulamasında 5 örnekte enzim kesimi gerçekleşmemiştir. Buna sonuçlara göre, iyi tanıli olgularda G13964C genotiplerinin yüzdeleri, %12.5 GG homozigot, %75.0 GC heterozigot, %12.5 CC homozigot, orta tanıli olgularda %30.0 GG homozigot, %65.0 GC heterozigot, %5.0 CC homozigot, kötü tanıli olgularda %100.0 GC heterozigot olarak tespit edilmiştir. Tüm kolon kanserli olgularda G13964C polimorfizm sonuçları %23.3 GG homozigot, %70.0 GC heterozigot, %6.7 CC homozigot genotipleri bulunmuştur. P53 mutasyonu saptamak için G13964C polimorfizmde kötü tanıli olgularda GG homozigotu ve CC homozigotu saptanmamıştır. Yapılan *t-testinin* tanılar arasında G13964C polimorfizmi bakımından fark olmadığı tespit edilmiştir ($p=0.693>0.05$). Tanıya göre, G13964C polimorfizmini veren GG homozigot, GC heterozigot, CC homozigot genotip yüzdeleri Tablo 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4.11. Tanıya göre Arg72Pro polimorfizmini veren Arg/Arg homozigot, Arg/Pro heterozigot, Pro/Pro homozigot genotip yüzdeleri.

			Arg72Pro			Toplam
			AA	AP	PP	
TANI	İyi	Sayı	3	4		7
		Tanı içindeki %	42,9%	57,1%		100,0%
		Arg72Pro içindeki %	21,4%	36,4%		25,9%
		Toplam %'si	11,1%	14,8%		25,9%
	Orta	Sayı	10	6	2	18
		Tanı içindeki %	55,6%	33,3%	11,1%	100,0%
		Arg72Pro içindeki %	71,4%	54,5%	100,0%	66,7%
		Toplam %'si	37,0%	22,2%	7,4%	66,7%
	Kötü	Sayı	1	1		2
		Tanı içindeki	50,0%	50,0%		100,0%
		Arg72Pro içindeki %	7,1%	9,1%		7,4%
		Toplam %'si	3,7%	3,7%		7,4%
Toplam	Sayı	14	11	2	27	
	Tanı içindeki %	51,9%	40,7%	7,4%	100,0%	
	Arg72Pro içindeki %	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	Toplam	51,9%	40,7%	7,4%	100,0%	

Tablo 4.12. Tanıların G13964C polimorfizm GG homozigot, GC heterozigot ve CC homozigot yüzdeleri.

		G13964C			Toplam	
		GG	GC	CC		
TANI	İyi	Sayı	1	6	1	8
		Tanı içindeki %	12,5%	75,0%	12,5%	100,0%
		G13964C içindeki %	14,3%	28,6%	50,0%	26,7%
		Toplam %'si	3,3%	20,0%	3,3%	26,7%
	Orta	Sayı	6	13	1	20
		Tanı içindeki %	30,0%	65,0%	5,0%	100,0%
		G13964C içindeki %	85,7%	61,9%	50,0%	66,7%
		Toplam %'si	20,0%	43,3%	3,3%	66,7%
	Kötü	Sayı		2		2
		Tanı içindeki %		100,0%		100,0%
		G13964C içindeki %		9,5%		6,7%
		Toplam %'si		6,7%		6,7%
Toplam	Sayı	7	21	2	30	
	Tanı içindeki %	23,3%	70,0%	6,7%	100,0%	
	G13964C içindeki	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	Toplam %'si	23,3%	70,0%	6,7%	100,0%	

4.3.7. Arg72Pro ve G13964C Polimorfizm için Frekans Değerlendirmesi

p53 mutasyonunu saptamak için, Arg72Pro bölgesinin enzim kesiminde 8 (%22.9) örnekte enzim kesimi gerçekleşmediğinde bulunan oranlar 14 (%40.0) Arg/Arg homozigot, 11 (%31.4) Arg/Pro heterozigot, 2 (%5.7) Pro/Pro homozigot sonuçları tespit edilmiştir. Enzim kesimi gerçekleşmeyen örnekleri hesaplamaya almadığımızda ki yüzdeler %51.9 Arg/Arg homozigot, %40.7 Arg/Pro heterozigot, %7.4 Pro/Pro homozigot olarak tespit edilmiştir. 27 olgudan 11'i (%40.7) Arg/Pro heterozigot olup, 11 heterozigot olgudan 8'i (%72.72) heterozigosite kaybına uğramıştır. (Tablo 4.13 ve Tablo4.15)

P53 mutasyonunu saptamak için G13964C intronik varyant polimorfizminin enzim kesim sonuçları 5(%14,3) örnekte enzim kesimi gerçekleşmediğinden bulunan oranlar 7 (%20.0) GG homozigot, 21(%60.0) GC heterozigot, 2(%5.7) CC homozigot olarak tespit edilmiştir. Enzim kesimi gerçekleşmeyen örnekleri

hesaplamaya almadığımızda ki yüzdeler %23.3 GG homozigot, %70.0 GC heterozigot, %6.7 CC homozigot olarak tespit edilmiştir. 30 olgudan 21 (%70.0) GC heterozigot olup, 21 olgudan heterozigot 7 (%70.0) olgu da heterozigosite göstermiştir (Tablo 4.14 ve Tablo 4.15)

P53 mutasyonu için Ar72Pro polimorfizmde 60 ve altı yaş grubunda Arg/Arg homozigot genotipi predominant (baskın) olmaya eğilimli, 61 ve üzerinde Arg/Arg homozigot baskın bulunmuştur, yaş grupları ve Arg72Pro arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon yoktur. (Tablo 4.16). Cinsiyetler arasında Ar72Pro polimorfizmde kadınlarda Arg/Pro heterozigot oranı daha yüksek iken, erkekler arasında Arg/Arg oranı daha yüksektir. Cinsiyetler açısından p53 mutasyonu için Arg72Pro polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon yoktur (Tablo 4.16). İyi tanıli olgularda Arg/Pro frekansı daha yüksek, orta tanıli olgularda Arg/Arg frekansı yüksektir, oysa kötü tanıli olgularda Arg/Arg ve Arg/Pro frekansları eşit olarak hesaplanmıştır. Tanılar açısından p53 mutasyonu için Arg72Pro polimorfizmde istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon yoktur (Tablo 4.16). Arg72Pro polimorfizm frekansı hesaplandığında Arg/Arg homozigot frekansı yüksektir (Tablo 4.16).

Tablo 4.13 . Arg72Pro polimorfizmi için frekans değerleri

		Frekans	Yüzde oranı	Geçerli yüzde oranı	Artan yüzde
Geçerli	AA	14	40,0	51,9	51,9
	AP	11	31,4	40,7	92,6
	PP	2	5,7	7,4	100,0
	Toplam	27	77,1	100,0	
Kayıp	Sistem	8	22,9		
Toplam		35	100,0		

Tablo 4.14.G13964G polimorfizmi için frekans değerleri

		Frekans	Yüzde oranı	Geçerli yüzde oranı	Artan yüzde
Geçerli	GG	7	20,0	23,3	23,3
	GC	21	60,0	70,0	93,3
	CC	2	5,7	6,7	100,0
	Toplam	30	85,7	100,0	
Kayıp	Sistem	5	14,3		
Toplam		35	100,0		

Tablo 4.15. Arg72Pro ve G13964C polimorfizmleri için LOH analizi sonuçları.

Çalışılan Bölgeler	İnformative Sonucu	LOH
Arg72Pro	11/27(Arg/Pro) % 40.7	8/11 %72.72
G13964C	21/30 (GC) % 70.0	7/21 %70.0

Tablo 4.16. Kolon kanserli olguların Arg72Pro bölgesi için klinopatolojik veri ve genetik ilişkisi.

	Arg/Arg(%)	Arg/Pro(%)	Pro/Pro(%)	p
<u>Yaş</u>				
60 ve altı	53.8	38.5	7.7	0,983
61 ve üzeri	50.0	42.9	7.1	
<u>Cinsiyet</u>				
Kadın	43.8	50.0	6.3	0,498
Erkek	63.6	27.3	9.1	
<u>Tanı</u>				
İyi	42.9	57.1	-	0,753
Orta	55.6	33.3	11.1	
Kötü	50.0	50,0	-	
<u>Frekans</u>	51,9	40,7	7,4	

P53 mutasyonu için G13964C intronik varyant polimorfizmde 60 ve altı yaş ile 61 ve üzerinde ki yaş grubunda GC heterozigot genotip predominant olmaya eğilimlidir. yaş grupları ve G13964C arasında istatikselsel olarak anlamlı bir korelasyon yoktur. (Tablo 4.17). Cinsiyetler arasında Ar72Pro polimorfizmde kadınlarda GC heterozigot oranı daha yüksektir, erkeklerde de GC heterozigot oranı yüksektir. Cinsiyetler açısından p53 mutasyonu için G13964C intronik varyant polimorfizmi arasında istatikselsel olarak anlamlı bir korelasyon yoktur (Tablo 4.17). İyi tanıli olgularda GC heterozigot frekansı daha yüksek, orta tanıli

olgularda GC heterozigot frekansı yüksektir ve bu oran kötü tanılı olgularda ise çok daha yüksektir. Tanılar açısından p53 mutasyonu için G13964C intronik varyant polimorfizmde istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon yoktur (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. Kolon kanserli olguların G13964C polimorfizm için klinopatolojik veri ve genetik ilişkisi

	GG (%)	GC (%)	CC (%)	p
<u>Yaş</u>				
60 ve altı	20.0	73.3	6.7	0,909
61 ve üzeri	26.7	66.7	6.7	
<u>Cinsiyet</u>				
Kadın	23.5	70.6	5,9	0,981
Erkek	23.1	69.2	7,7	
<u>Tanı</u>				
İyi	12.5	75.0	12.5	0,693
Orta	30.0	65.0	5.0	
Kötü	-	100.0	-	
<u>Frekans</u>	51,9	40,7	7,4	

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Moleküler ve hücre biyolojisindeki son ilerlemeler, normal hücrelerin malignansiye doğru transformasyonuna sebep olabilen kompleks değişimleri açıklamaktadır. Büyüyen katı tümörlere dönüşebilen malignant hücre klonlarının değiştirilemeyen gelişimleri için, kritik basamakları anlatan birçok geniş konseptler anlatılmaktadır (Forslund et al. 2002). Mutasyonlu hücreye genişleme kapasitesini sağlayan belirli genlerin ekspresyonu veya biyokimyasal fonksiyonu etkileyen DNA'daki değişimler kanserlere sebep olur. Genellikle birkaç gendeki mutasyonlara ihtiyaç duyan multistep bir prosedir ve mutasyonlu hücrelerde ortaya çıkan kontrolsüz klon büyümesi ile sonuçlanır. Kanser araştırmasının asıl amacı, karsinogeneze yol açan genlerin ve mutasyonların tanımlanmasıdır. Bu bilgi daha sonra teşhis ve tedavi için yeni hedeflere dönüştürülebilir. Kansere sebep olan genler üç farklı grupta sınıflandırılmaktadır: proto-onkogenler, tümör süpresör genler ve stabil genler (Furney et al., 2006).

Tümör süpresör gen olarak rolü nedeniyle *p53* geni, en kapsamlı çalışılan insan genlerinden biridir. *p53* geninin çeşitli fonksiyonları; DNA'ya bağlanma, hücre siklusu kontrolü, DNA tamiri, farklılaşma, genomik düzensizlik ve apoptosisi kapsar. Böylece *p53*'ün tüm fonksiyonları, tümör genesise karşı koruyuculuğu sağlayan, tamamen genomik güvenilirliği korumaktadır (Zhu et al., 2005). *p53* mutasyonlarının rolü, hastalık oluşumu üzerine ardışık etkisiyle, hücre siklusunun *p53* kontrolünde anormal fonksiyonel etkileri kadar, malignant adenoma gelişimi ile karsinoma oluşumunun her ikisini de açıklayabilir (Forslund et al., 2002).

En önemli *p53* polimorfizmi prolin (72Pro:CCC) veya arjinini (72Arg:CGC) kodlayan ekson 4 kodon 72'de restriksiyon parça uzunluk polimorfizmidir (Schneider-Stock et al., 2004). Kolorektal ve meme karsinomlarını içeren birçok kanser hastalığında sonuçlar şüpheli kalmasına rağmen, kodon 72 polimorfizmi ve kanser riski arasındaki anlamlı ilişki rapor edilmiştir (Langerød et al.2002). Ekson 4 kodon 72'deki polimorfizm allelleri nonpolar alifatik yan zincirli prolin residüsü

(CCC, Pro72) ve pozitif yüklü temel yan zincirli arjinin aminoasidini (CGC, Arg72) kodlar (Kalemi et al. 2004, Langerød et al. 2002).

p53 tümör suppressor geni apoptoziste, hücre siklusu kontrolünde ve DNA tamirinde önemli rol oynamaktadır. Arg-Pro süstitüsyonunun, Afrikalı American toplumlarında ve Kafkaslarda *p53* geni kodon 72 polimorfizmine yol açarak diğer kanser türleri kadar akciğer kanserine sebebiyet verdiği bildirilmiştir (Hu et al.2005).

Wild tip *p53*'ün 72Arg formu, wild tip 72Pro'dan insan papillomavirüsün E6 proteiniyle proteoliz aracılığında daha hassas olduğu bulunmuştur. Üstelik, *p53* ilişkili tümörün kodon 72 durumu, onların *p73* ile heterodimer olup olmadığına karar belirlemektedir (Schneider-Stock et al., 2004).

Arg/Pro polimorfizmi, SH3' e bağlanan domaine benzeyen beş PXXP motiflerinden biri Pro72 aminoasidini oluşturduğu TP53 proteinin proline zengin bölgede (64-92 residüleri) lokalizedir. Bu bölgeye TP53 aracılığıyla apoptosis ve hücre siklusunun baskılanması için ihtiyaç duyulur, fakat hücre siklusunun durması için gerekli değildir. Wild tip *p53*'ün iki farklı polimorfik değişimi, transkripsiyon mekanizmasının farklı bileşenlerine bağlanma ve transkripsiyonun farklı aktivasyonu gibi birkaç farklı biyokimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir, fakat onların DNA'ya bağlanma yetenekleri farklı değildir (Langerød et al. 2002).

İntronik varyantlar, DNA-protein önemli etkileşiminin bozulması yoluyla veya tipik olmayan eklemeler yoluyla gen düzenlemesini tetikleyebilirler (Marsh et al. 2001). Son zamanlarda, Buyru ve arkadaşlarının çalışmalarına göre, Buller et al. *p53*' ün 13964 nükleotitdeki intronik C'nin G'ye baz değişimini rapor etmiştir. *p53* G13964C yerine, tekrar ekleme bölgesi yoktur ve dolayısıyla *p53* ekspresyonunu etkilediğine dair doğrudan bir kanıt yoktur (Buyru et al. 2005).

Çalışmamızda kolon kanseri tanısı konmuş 35 olguya ait tümör doku örnekleri kullanılmıştır. Referans alınan literatürlerde *p53* mutasyonu Arg72Pro

polimorfizmi ve G13964C intronik variant polimorfizm analizini gerçekleştirmek için PCR-RFLP yöntemi kullanıldığı için, bu bölgelerdeki gen polimorfizmini saptamak amacıyla bizde PCR-RFLP yöntemini tercih ettik. Çalışmamız için *p53* genine ait Arg72Pro (ekson 4) ve G13964C (intron 6) bölgeleri için dimer oluşturmayacak primer sekansı belirlendi ve steril laboratuvar şartlarında çalışıldı. Polimorfizm oluşumlarını saptayabilmek için seçtiğimiz primerler literatürle uyumludur (Hu et al.2005, Zhu et al.2005, Fiszer-Maliszewska et al.2003).

5.1. Örnekler, DNA İzolasyonu ve PCR Sonuçları Tartışması

Pérez ve ark.(2006), *p53* kodon 72 polimorfizmi ile ilgili araştırmalarında 53 kolon kanserli olguya ait parafine gömülü doku, Langerød ve arkadaşları, 2002, 162 kolon kanserli olguya ait parafine gömülü tümör dokusunda, Schneider-Stock ve ark.(2004) ile Buyru ve ark.(2005) ise çalışmalarında sırasıyla 76, 55 kolon kanserli olguya ait kan örneği kullanmışlardır. Kolon kanseri metastaz yapmadığı sürece kanda çalışılması informatif olmayacağından, çalışmamızda literatür bilgileri doğrultusunda güvenilir bir mutasyon çalışması için kolon kanseri tanısı konulmuş parafine gömülü tümör doku örnekleri kullanılmıştır.

5.2.Enzimatik Kesim Sonuçları

Çalışmamızda elde ettiğimiz amplikonları BstFNI ve BstHHI restriksiyon enzimleri ile kestik. BstFNI Arg/Arg homozigotu için 113bp ve 86 bp uzunluğunda iki band, Arg/Pro heterozigotu için 119bp,113bp ve 86 bp olmak üzere üç band ve Pro/Pro homozigotu 199bp'lik tek band gösterdi. Arg72Pro genotiplerinin belirlenmesi için seçilen BstFNI restriksiyon enzimi ve kesim sonuçları literatürle uyumludur (Zhu et al.2005).

BstHHI GG homozigotu için 175bp ve 32 bp uzunluğunda iki band, GC heterozigotu için 207 bp, 175 bp ve 32bp olmak üzere üç band ve CC homozigotu 207 bp'lik tek band gösterdi. G13964C genotiplerinin belirlenmesi için seçilen

BstHHI restriksiyon enzimi ve kesim sonuçları literatürle uyumludur (Fiszermaliszewska et al.2003, Buyru et al 2005).

5.2.1. Yaş ve Cinsiyet Değerlendirmesi

Çalışmamızda incelemeye alınan kadın olguların ortalama yaşı (65,95±2,76) iken erkek olguların ortalama yaşı (61,67±3,07) ve her iki cinsiyette toplam kolon kanserli olguların yaş ortalaması (64,11±2,06) olarak hesaplanmıştır. İstatistiki değerlendirmede kullanılan *t-testi* sonucunda cinsiyetler arasında yaş bakımından anlamlı bir fark yoktur ($p=0.307>0.05$). Çalışmamız için kullandığımız olguların yaş grubu literatürle uyumludur (Schneider-Stock et al., 2004).

İlerleyen yaşla birlikte kolorektal kanser riskinin arttığı bilinmektedir (Konishi ve Morson 1981). Daha önceki çalışmalarda istatistiksel olarak fark olmamasına rağmen ($p<0.001$) yaş ile çeşitli displaziler arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir. 70 yaşın üzerinde çeşitli displazilere eğilimin artış gösterdiği, bunda kanser riskini artırdığı bildirilmiştir (Eide 1978, Silverberg 1970 ve Kozuka 1975).

5.2.2. Cinsiyetlere göre Arg72Pro ve G13964C Mutasyon Sonuçları

Son zamanda yapılan çalışmalar, p53 geninin 72. kodonundaki polimorfizmin yaygın olduğunu göstermiştir, biyolojik ve biyokimyasal olarak farklılık iki allele arjinin (72Arg) ve prolin (72Pro) izoformlarında sonuçlanmaktadır (Pérez et al. 2006).

Çalışmamızda Arg72Pro bölgesinin enzim kesimi sonucu Arg/Arg, Arg/Pro ve Pro/Pro olmak üzere üç farklı sonuç elde edilmiştir. Kadın olguların genotip oranları Arg/Arg %43.8, Arg/Pro oranı %50.0, Pro/Pro oranı %6.3, bulunurken erkek olguların genotip oranları Arg/Arg oranı %63.6 Arg/Pro oranı, %27.3 Pro/Pro oranı %9.1 olarak bulundu. Cinsiyetlerin herikisi birden değerlendirmeye alındığında toplam genotip oranları Arg/Arg %51.9, Arg/Pro%40.7, Pro/Pro%7.4 olarak bulunmuştur. Yapılan *t-testi* sonucunda cinsiyetler arasında yaş bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0.498>0.05$).

Schneider-Stock ve ark.(2004), kolon kanserli olgularda yapmış oldukları çalışmada kadınlar arasında Arg/Arg oranını %57.4, Arg/Pro oranını %32.1 ve Pro/Pro oranını %7.1 olarak bulurken, erkekler arasında Arg/Arg oranını %54.5, Arg/Pro oranını %33.3 ve Pro/Pro oranını %12.1 olarak yayınlamışlardır. Cinsiyetler arasında Arg72Pro polimorfizmi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir ($p=0.783>0.05$). Genotip oranları ve cinsiyetler açısından çalışmamız literatürle uyumludur.

De Lima ve ark.(2006), kolon kanserli olgularda yapmış oldukları çalışmada kadınlar arasında Arg/Arg oranını %58.5, Arg/Pro oranını %45.3 ve Pro/Pro oranını %1.9 bulurken, erkekler arasında Arg/Arg oranını %53.2, Arg/Pro oranını %29.8 ve Pro/Pro oranını %10.6 olarak yayınlamışlardır. Cinsiyetler arasında Arg72Pro polimorfizmi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir ($p=0.100>0.05$). Genotip oranları ve cinsiyetler açısından çalışmamız literatürle uyumludur.

Hu ve ark.(2005), *p53* geni kodon 72 genotipini çeşitli klinik ve patolojik değerlendirmeler açısından Arg72Pro polimorfizmini akciğer kanserli olgularda çalışmışlar ve cinsiyetle bu bölge mutasyonu arasında fark olmadığını bildirmişlerdir ($p=0.960>0.05$). Çalışma sonuçlarımız literatürle uyum göstermektedir.

Çalışmamızda *p53* mutasyonu G13964C intronik varyant polimorfizmini veren genotipler; incelenen kadın olgularda GG homozigot oranı %23.5, GC heterozigot oranı % 70.6 ve CC homozigot oranı % 5.9 bulunmuştur. Erkek olgularda ise GG homozigot oranı %23.1, GC heterozigot oranı % 69.2 ve CC homozigot oranı ise %7.7 olarak hesaplanmıştır. Yapılan t-testi sonucunda cinsiyetler arasında G13964C polimorfizmi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0.981>0.05$).

5.2.3.Cinsiyet ve Tanı Sonuçları

Yaptığımız çalışmada iyi, orta, kötü olmak üzere 3 farklı tanıli kolon kanserine ait olguların doku örneklerini kullandık. Buna göre, kadınlar arasında iyi, orta ve kötü tanılarının oranları sırasıyla %30.0, %60.0, %10.0 ve erkekler arasında ise bu oranlar %113.3, %86.7 olarak bulunurken, kötü tanıli olgu bulunmamaktadır. Çalışmamızda cinsiyet ve tanı arasında anlamlı bir ilişki yoktur ($p=0.183>0.05$). Schneider-Stock et al.(2004) cinsiyet ve tanı karşılaştırmasında ($p= 0.320 >0.05$) olarak bildirmiştir, çalışma sonucumuz literatürle uyumludur.

Hu ve ark.(2005), *p53* geni kodon 72 genotipini çeşitli klinik ve patolojik değerlendirmeler açısından Arg72Pro polimorfizmini akciğer kanserli olgularda çalışmışlar ve tanılarının bu bölge mutasyonu arasında fark olmadığını bildirmişlerdir ($p=0.610>0.05$) . Çalışma sonuçlarımız literatürle uyum göstermektedir.

5.2.4.Yaş Gruplarının Arg72Pro ve G13964C Mutasyon Sonuçları

Çalışmamızda Arg72Pro polimorfizmde belirlediğimiz 60 ve altı yaş aralığında Arg/Arg Arg/Pro, Pro/Pro genotiplerinin oranları sırasıyla %53.8, %38.5 ve %7.7 olarak hesaplanırken, 61 ve üzeri yaş aralığında Arg/Arg Arg/Pro, Pro/Pro genotiplerinin oranları sırasıyla%50.0, %42.9 ve %7.1 olarak hesaplanmıştır. Yaş aralıkları ile çalışılan *p53* mutasyonu için Arg72Pro polimorfizmi arasında fark olmadığı görülmüştür ($p=0.973>0.05$).

Hu ve ark.(2005), *p53* geni kodon 72 genotipini çeşitli klinik ve patolojik değerlendirmeler açısından Arg72Pro polimorfizmini akciğer kanserli olgularda çalışmışlar ve yaş grupları ile Arg72Pro polimorfizmi arasında fark olmadığını bildirmişlerdir ($p=0.370>0.05$). Çalışma sonuçlarımız literatürle uyum göstermektedir.

Schneider-Stock ve ark.(2004), kolon kanserli olgularda 61 yaş ve üzerindeki bireylerde Arg/Arg %63.1, Arg/Pro %64.5 ve Pro /Pro %63.2 olarak bulmuş ve

yaş grupları ile Arg72Pro polimorfizmi arasında fark olmadığını bildirmişlerdir ($p=0.901>0.05$). Çalışma sonuçlarımız fark olmaması açısından literatürle uyumludur, ancak Pro/Pro oranının yüksek çıkmasının olgu sayılarının fazla olmasıyla ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Çalıştığımız diğer bir bölgedeki G13964C intronik varyant polimorfizmi, 60 ve altı yaş aralığında GG, GC, CC oranları sırasıyla % 20.0, %73.3, %6.7, 61 ve üzeri yaş aralığında ise %26.7, %66.7, %6.7 bulunmuştur. Yaş aralıkları ve p53 mutasyonu G13964C intronik varyant polimorfizmi arasında fark yoktur ($p=0.909>0.05$).

5.2.5.Yaş Grupları ve Tanı Sonuçları

Çalışmamızda 60 ve altındaki yaş aralığında %25.0 oranında iyi, %68.6 oranında orta, %6.3 oranında kötü olgu bulunurken, 61 ve üzerindeki yaş aralığında %21.1 oranında iyi, %73.7 oranında orta ve %5.3 oranında kötü olgu bulunmuştur. Yaş grupları ve tanılar (iyi, orta, kötü) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0.950>0.05$)

5.2.6. Tanıya göre Arg72Pro ve G13964C Mutasyon Sonuçları

Çalışmamızda iyi tanıli olgularda Arg72Pro genotiplerinin yüzdeleri %42.9 Arg/Arg, %57.1 Arg/Pro, orta tanıli olgularda %55.6 Arg/Arg, %33.3 Arg/Pro, %11.1 Pro/Pro, kötü tanıli olgularda %50.0 Arg/Arg, %50.0 Arg/Pro oranları bulunmuştur. Tanı ve p53 mutasyonu için Arg72Pro polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0.753>0.05$).

Schneider-Stock ve ark.(2004), yapmış oldukları çalışmada p53 mutasyonu için Arg72Pro polimorfizm genotipleri sonucu ile tanı değerlendirmesinde iyi tanıli olgularda %80.0 Arg/Arg, %20.0 Pro/Pro, orta tanıli olgularda %57.4 Arg/Arg, %31.9 Arg/Pro, %10.6 Pro/Pro genotip ve kötü tanıli olgularda %44.4 Arg/Arg,

%55.6 Arg/Pro oranlarını bildirmişlerdir ($p=265>0.05$). Tanıya göre Arg72Pro genotip oranları açısından sonuçlarımız literatürle son derece uyum içerisindedir.

De Lima ve ark.(2006), kolon kanserli olgularda Arg72Pro polimorfizm çalışmalarına göre, tanı ile Arg72Pro polimorfizmi arasında fark yoktur ($p=0.430>0.05$). Tanıya göre Arg72Pro genotip oranları açısından sonuçlarımız literatürle uyum içerisindedir.

Hu ve ark.(2005), *p53* geni kodon 72 genotipini çeşitli klinik ve patolojik değerlendirmeler açısından Arg72Pro polimorfizmini akciğer kanserli olgularda çalışmışlar ve tanı ile bu bölge mutasyonu arasında fark olmadığını bildirmişlerdir ($p=0.940>0.05$). Çalışma sonuçlarımız literatürle uyum göstermektedir.

Çalışmamızda G13964C polimorfizm genotipleri ile tanı değerlendirmesinde iyi tanıli olgularda %12.5 GG genotip, %75.0 GC genotip, %12.5 CC genotip, orta tanıli olgularda %30.0 GG genotip, %65.0 GC genotip, %50 CC genotip, kötü tanıli olgularda %100.0 GC genotip oranları elde edilmiştir. Tanı ve *p53* mutasyonu için G13964C intronik varyant polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0.693>0.05$).

5.2.7. Arg72Pro ve G13964C Polimorfizmlerinin Mutasyon Değerlendirmesi

p53 mutasyonunu saptamak için, Arg72Pro bölgesinin enzim kesiminde 8 (%22.9) örnekte enzim kesimi gerçekleşmediğinden bulunan frekans oranları 14 (%40.0) Arg/Arg homozigot, 11 (%31.4) Arg/Pro heterozigot, 2 (%5.7) Pro/Pro homozigot sonuçları tespit edilmiştir. Enzim kesimi gerçekleşmeyen örnekleri hesaplama yapmadığımızda frekans yüzdeleri %51.9 Arg/Arg homozigot, %40.7 Arg/Pro heterozigot, %7.4 Pro/Pro homozigot olarak tespit edilmiştir. 27 olgudan 11'i (%40.7) Arg/Pro heterozigot olup, 11 heterozigot olgudan 8'i (%72.7) heterozigosite kaybına (LOH) uğramıştır. Bu sonuçlarımıza göre Arg/Arg homozigotunun kolon kanserli olgularımızda Arg72Pro polimorfizm oranını artırdığı kanısına varabiliriz.

Buyru ve ark.(2003), istatistiksel olarak yaptıkları değerlendirmede Türk toplumunda arjinin (Arg) alelinin meme kanseri gelişiminde önemli olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonuçlarımıza göre Arg/Arg homozigot oranının yüksek olması, kolon kanserinde de Arg alelinin mutasyona yol açarak kolon kanserine neden olduğu hipotezimizi desteklemektedir.

Schneider-Stock ve ark.(2004), Arg72Pro için LOH değerini % 62.2 olarak bildirmişlerdir, Arg72Pro için LOH değerimiz literatürle uyumludur.

Xiao-Mou ve ark.(1998), hepatocellüler karsinomada yapmış oldukları çalışmada ekson 4 kodon 72'deki CGC/CCC heterozigot lokalizasyonu açısından LOH değeri %68.4 olarak bildirilmiştir. Arg72Pro için hesapladığımız LOH değeri literatürle uyumludur.

Pérez ve ark.(2006), yapmış oldukları çalışmada Arg/Arg homozigot oranını %58.5, Arg/Pro heterozigot oranını %37.7, Pro/Pro homozigot oranını %3.8 olarak bildirmişlerdir. Kolon kanseri gelişiminde *p53* geni Arg72Pro polimorfizmi için Arg/Arg homozigot genotipinin kolon kanseri gelişiminde genetik bir yatkınlık olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir, yapılan bu çalışma sonuçları çalışmamızla uyum içerisindedir.

Schneider-Stock ve ark.(2004), tarafından yapılmış olan bir diğer çalışmada ise *p53* geni için Arg72Pro mutasyon oranları Arg/Arg %47.3, Arg/Pro %44.1, Pro/Pro %8.6 olarak bildirmişlerdir. Kolorektal adenokarsinom gruplarında Arg allel mutasyonunun diğer genotiplere göre daha yüksek olarak bulmaları çalışmamızla uyum içerisindedir.

De Lima ve ark.(2006), tarafından yapılmış olan bir diğer çalışmada ise *p53* geni için Arg72Pro mutasyon oranları Arg/Arg %56, Pro/Pro %6 olarak bildirmişlerdir. *p53* geni Arg72 Pro polimorfizmi için Arg/Pro heterozigot frekansının kolon kanseri riskini artırmadığı, buna karşılık Arg/Arg homozigotunun kolon kanseri gelişimi ile yakından ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir, sonuçlar çalışmamızla uyumludur.

Langerød ve ark.(2002), yayınladıkları oranlar ise Pro72 %43.8 ve Arg72 %41.2'dir. Bu çalışmada bizim sonuçlarımızdan farklı olarak Pro allel mutasyonunun kolon kanseri riskini artırdığını bildirmişlerdir.

p53 mutasyonunu saptamak için G13964C intronik varyant polimorfizminin enzim kesim sonuçlarında 5(%14,3) örnekte enzim kesimi gerçekleşmediğinden bulunan frekans oranları 7 (%20.0) GG homozigot, 21(%60.0) GC heterozigot, 2(%5.7) CC homozigot olarak tespit edilmiştir. Enzim kesimi gerçekleşmeyen örnekleri hesaplama almamızda frekans yüzdeleri %23.3 GG homozigot, %70.0 GC heterozigot, %6.7 CC homozigot olarak tespit edilmiştir. 30 olgudan 21 (%70.0) GC heterozigot olup, 21 olgudan heterozigot 7 (%70.0) olgu da heterozigosite kaybı (LOH) göstermiştir.

Buyru ve ark.(2005), G13964C üzerine yaptığı çalışmada %85.5 GG, %12.7 GC ve %1.8 CC oranlarını bulmuşlardır. Buyru ve arkadaşları yaptıkları çalışmanın sonucunda intron 6 polimorfik varyantının bireylerde kolayca etkilendiği hipotezini desteklemediğini açıklamışlardır. Fiszer-Maliszewska ve ark..(2003) Polonya kanser ailelerinde G13964C polimorfizmi insidans araştırmalarında kanser riski ve G13964C varyasyonu arasında bir ilişki olmadığı sonucuna varmışlardır.

Schneider-Stock et al. (2004), p53 heterozigosite kaybı ile ilgili çalışma olmasına rağmen kolon kanserinde bir allelin kaybı için henüz araştırmaların yeterli olmadığını bildirmiştir. Böylece ekson 4 polimorfizmi çift uyumda, p53-LOH frekansının çalışılmasının ve polimorfizmin belirlenmesinin kanser oluşumu aşamalarını aydınlatılabileceğini bildirmişlerdir.

6.1 KAYNAKLAR

- Ağaçhan, B., 2003, "Rekombinant DNA Teknolojisi", Kalıtsal Hastalıklar Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu, Eylül, 184-185, 190-191
- Ambis, S., Hussain, S., P., Haris, C., C., 1997, "Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression, FASEB J., March, Vol. 11, pp. 443-448.
- American Cancer Society, 2005, "Colorectal Cancer Staging", CA Cancer J Clin, December, Vol. 54, pp. 362-365.
- Baker, S. J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., VanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., 1989, "Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas", Science, Vol. 244, pp. 217.
- Bérout, C., Verdier, F., and Soussi, T., 1996, "p53 gene mutation : software and database ", Nucleic Acids Research, October, Vol. 24, pp. 147-150.
- Boyle, P, Langman, J.S., 2000, "ABC of colorectal cancer: Epidemiology", BMJ, September, Vol. 321, pp. 805-808.
- Brázdová, M., Paleček, J., Cherny, D., I., Billová, S., Fojta, M., Pečinka, P., Vojtíšek, B., Jovin, T., and Paleček, E., 2002, "Role of tumor suppressor p53 domains in selective binding to supercoiled DNA", Nucleic Acids Research, September, Vol. 30, pp. 4966-4974.
- Bunz, F., Fauth, C., Speicher, M.R., Durriaux, A., Sedivy, J.M., Kinzler, K., W., Vogelstein, B., and Lengauer, C., 2002, "Targeted Inactivation of p53 in Human Cells Does Not Result In Aneuploidy", Cancer Research, February, Vol. 62, pp. 1129-1133.
- Buyru, N., Budak, M., Yazıcı, H., and Dalay, N., 2003, "P53 gene mutations are rare in human papillomavirus-associated colon cancer", ONCOLOGY REPORTS, July, Vol. 10, pp. 2089-2092.
- Buyru, N., Tezol, A., Dalay, N., 2005, "p53 Intronic G13964C Variant in colon Cancer and its association with HPV", ANTICANCER RESEARCH, February, Vol. 25, pp. 2767-2770.
- Caelles, C., Helmberg, A., Karin, M., 1994, "p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes", Nature, Vol. 370, pp. 220-223.
- Chang, S., Lin, K., Liang, Y., 2005, "Loss of heterozygosity: An independent prognostic factor of colorectal cancer", World of Gastroenterol, May, Vol. 11, pp. 778- 784.

- Cole, T.R.P., Sleightholme, H.V., 2000, "ABC of Colorectal cancer: The role of clinical genetics in management", *BMJ*, October, Vol. 321, pp. 943-946.
- Conlin, A., Smith, G., Carey, F.A., Wolf, C.R., and Steele, R.J.C., 2005, "The prognostic significance of K-ras, p53 and APC mutations in colorectal carcinoma", *Gut*, April, Vol. 12, pp. 1586-1590.
- DeLima, J., M., Serafim, P., V., P., Silva, I., D., C., G., Forones, N., M., 2006, "Estudo Do polimorfismo Genetico No Gene p53 (Códon 72) Em Cancer Colorretal", *Arq Gastroenterol*, Jan. Mar., Vol. 43, pp. 8-13.
- Deveci, Ş., D., Yüce, H., Etem, H, Doğru, O., Özercan, İ., 2004, "Kolorektal kanserlerdeki Kromozomal Değişikliklerin Tespiti", *F.Ü. Sağlık*, Vol. 18, pp. 175-180.
- Diergaarde, B., Vrieling, A., Kraats, A.A., Muijen, G.N.P., Kok, F.J., and Kampman, E., 2003, "Cigarette smoking and genetic alterations sporadic colon carcinomas", *Carcinogenesis*, September, Vol. 24, pp. 565-573.
- Eide, T, J, Stalsberg, H., 1978, "Polyps of the large intestine in Northern Norway", *Cancer*, Vol. 31, pp. 1260-1270.
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., 1993, "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression", *Cell*, Vol. 75, pp. 817-825.
- Fakharzadeh, S., Trusko, S. P., George, D. L., 1991, "Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line", *EMBO J.*, Vol. 10, pp. 1565-1569.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B., 1990, "A genetic model for colorectal tumorigenesis", *Cell*, Vol. 61, pp. 759-767.
- Fernandez-fernandez, M., R., Veprintsev, D., B., and Fersht, A., R., 2005, "Proteins of the 100 family regulate the oligomerization of p53 tumor suppressor", *PNAS*, March, Vol. 102, pp. 4735-4740.
- Fischer-Malszewska, L., Kazanowska, B., Kuśnierczyk, P., Mańczak, M., Niepiekło, W., Pochroń-Zeman, B Nowakowska, B., 2003, "Is p53 intronic G13964C associated with predisposition to cancer?", *J. Appl. Genet.*, September, Vol. 44, pp. 547-552.
- Fleisher D.E., 1999, "Chromoscopy and magnification endoscopy in the colon" *Gastrointest Endosc*, Vol. 49, pp. 45-9.

- Fuchs, S. Y., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S. N., Ronai, Z., 1998, "JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells", *Genes Dev.*, Vol. 12, pp. 2658-2663.
- Furney, S., J., Higgins, D., R., Ouzounis, López-Bigas, N., 2006, "Structural and functional properties of genes involved in human cancer", *BMC Genomics*, January, Vol. 7, pp. 1-11.
- Forslund, A., Kressner, U., Lönnroth, C., Anderson, M., Lindmark, G., Lundholm, K., 2002, "p53 mutations in colorectal cancer assessed in both genomic DNA and cDNA as compared to the presence of p53 LOH", *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*, April, Vol. 21, pp. 409-415.
- Gao, X., and Honn, K.V., 1995, "Recessive Oncogenes: Current Status", *Pathology Oncology Research*, March, Vol. 1, pp. 7-22.
- Hainaut, P., 2002, "Tumor-specific mutations in p53: the acid test", *Nat Med*, Vol. 8, pp. 21.
- Hainaut, P., Hernandez, T., Robinson, A., Rodriguez-Tome, P., Flores, T., Hollstein, M., Harris, C., C., and Montesano, R., 1998, "IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools", *Nucleic Acids Research*, October, Vol. 26, pp. 205-213.
- Hainaut, P., Soussi, T., Shomer, B., Holstein, M., Greenblatt, M., Hoving, E., Harris, C., C., and Montesano, R., 1997, "Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects", *Nucleic Acids Research*, October, Vol. 25, pp. 151-157.
- Hardy, R.G., Meltzer, S.J., and Jankowski, J.A., 2004, "ABC of colorectal cancer: Molecular basis for risk factors", *BMJ*, December, Vol. 321, pp. 886-889
- Harms, K., L., and Chen, X., 2005, "The C Terminus of Family Proteins Is a Cell Fate Determinant", *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, Mar., Vol. 25, pp. 2014-2030.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S. J., 1993, "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases", *Cell*, Vol. 75, pp. 805-816.
- Hendon, S.E ve Dipalma, J.A., 2005, "U.S. practices for colon cancer screening", *Division of Gastroenterology, University of South Alabama College of Medicine, Mobile, AL, USA*, December, Vol. 54(4), pp. 179-183.

- Hollstein, M., Shomer, B., Greenblatt, T., Hovig, E., Montesano, R., and –
146 Harris, C., C., 1996, “Somatic point mutations in the p53 gene of
human tumors and cell lines: updated compilation”, *Nucleic Acids
Research*, October, Vol. 24, pp. 141.
- Houlston, R., S., 2001, “What we could do now: molecular pathology of
colorectal cancer”, *F Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* March, Vol. 54, pp. 206-
214.
- Hu, Y., McDermott, M., P., Ahrendt, S., A., 2005, “The p53 Codon 72 Proline
Allele Is Associated With p53 Gene Mutation in Non-Small Cell Lung
Cancer”, *Human Cancer Biology*, Vol. 11, pp. 2502-2509.
- Indulski, J., A., Lutz, W., 1997, “Molecular epidemiology: cancer risk assessment
using biomarkers for detecting early health effects in individuals exposed
to occupational and environmental carcinogens”, *Rev. Environ. Health*,
May, Vol. 12, pp. 179-190.
- Ishida, S., Yamashita, T., Nakaya, U., and Tokino, T., 2000, “Adenovirus-
mediated Transfer of p53-related Genes Induces Apoptosis of Human
Cancer Cells”, *Jpn. J. Cancer Res.*, February, Vol. 91, pp. 174-180.
- Jin, S., and Levine, A. J., 2001, “The p53 functional circuit”, *Journal of Cell
Science*, Vol. 114, pp. 4139-4140.
- Kaesler, M., D., Pebernard, S., and Iggo, D., 2004, “Regulation of p53 Stability
and Function in HCT116 Colon Cancer Cells”, *THE JOURNAL OF
BIOLOGICAL CHEMISTRY*, February, Vol. 279, pp. 7598- 7605.
- Kalemi, T., G., Lambropoulos, A., F., Guerguiev, M., Chrisafi, S., Papazisis, K.,
T., Kotsis, A., 2004, “The association of p53 mutations and codon p53 72,
Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in
Northern Greece”, *Science Direct*, May, Vol. 222, pp. 57-65.
- Kaneko, N., Okuda, M., Toyama, N., Oikawa, T., Watanabe, M., Kanaya, N.,
Yazawa, M., Hasegawa, K., Morimoto, M., Hayashi, T., Une, S., Nakaichi,
M., Taura, Y., Tsujimoto, H., and Inokuma, H., 2005, “Detection of
centrosome amplification as a surrogate marker of dysfunction in the p53
pathway – p53 gene mutation or MDM2 overexpression”, *Blackwell
Publishing Ltd.*, Vol. 3, pp. 203-210.
- Kantarci, N., Doruker, P., and Haliloglu, T., 2006, “Cooperative Fluctuations
Point To the Dimerization Interface of p53 Core Domain”, *Biophys J
BioFAST*, April, Vol. 10, pp. 1-40.
- Konuk, M., 2004, “Moleküler Biyoloji”, *Nobel, Bölüm D, Türkiye*, syf. 64.

- Kovvali, G., Shiff, S., Telang, N., Das, K., Kohgo, Y., Narayan, S., and Li, H., 2003, "Carcinogenesis: the more we seek to know the more we need to know-challenges in the post Genomic Era. *J. Carcinog.* 2,1.
- Kozuka, S., Nogaki, M., Ozeki, T., Masumori, S., 1975, "Premalignancy of the mucosal polyp in the large intestine: II. Estimation of the periods required for malignant transformation of mucosal polyp", *Dis. Colon Rectum*, Vol. 18, pp. 494-500.
- Krajewska, W., M., Stawińska, M., Bryś, M., Mlynarski, W., Witas, H., Okruszek, A., Kiliańska, Z., M., 2003, "Genotyping of p53 codon 175 in colorectal cancer", *Med Sci Monit*, May, Vol. 9, pp. 228-231.
- Kudo S., Tamura S., Nakajima T. et al. Diagnosis of colorectal tumorous lesions by magnifying endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1996, 44: 8-14.
- Kuwabara, A., Watanabe, H., Ajikoka, Y., Yasuda, K., Saito, H., Matsuda, K., Kijima, H., and Hatakeyama, K., 1998, "Alteration of p53 Clonality Accompanying Colorectal Cancer Progression", *Jpn. J. Cancer Res.*, January, Vol. 89, pp. 40-46.
- Langerød, A., Bukholm, I., R., K., Bregård, A., Lønning, P., E., Andersen., T., I., Rognum, T., O., Meling, G., I., Lothe, R., A., Børresen-Dale, A., L., 2002, "The TP53 Codon 72 Polymorphism May Affect the Function of TP53 Mutations in Breast Carcinomas but not in Colorectal Carcinomas", *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, December, Vol. 11, pp. 1684-1688.
- Lee, J. M., Bernstein, A., 1993, "p53 mutations increase resistance to ionizing radiation", *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 90, pp. 5742-5746.
- Lee, S., Hong, S.W., Shin, S.J., Kim, Y.M., Rhee, Y., Jeon, B.I., moon, W.C., Oh, M.R., ve Lim, S.K., 2004, "Papillary Thyroid Carcinoma Associated with Familial Adenomatous Polyposis: Molecular Analysis of Pathogenesis in a Family and Review of the Literature", *Endocrine Journal*, February, Vol. 51, pp. 317-323.
- Li, Y., Raffo, A., J., Drew, L., Mao, Y., Tran, A., Petrylak, D., P., and Fine, R., L., 2003, "Fas-Mediated Apoptosis Is Dependent on Wild-Type p53 Status in Human Cancer Cells Expressing a Temperature-Sensitive p53 Mutant Alanine-143", *CANCER RESEARCH*, April, Vol. 63, pp. 1527-1533.
- Liang, S-H., and Clarke, M., F., 2001, "Regulation of p53 localization", *Eur. J. Biochem.*, March, Vol. 268, pp. 2779-2783.

- Linzer, D. I., Maltzman, W, Levine, A.J., 1979, "The SV40 A gene is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen", *Virology*, Vol. 98, pp.308.
- Lynch, H.T., ve Chapelle, A, de la., 1999, "Genetic susceptibility ton on-polyposis colorectal cancer", *J. Med. Genet.*, August, Vol. 36, pp. 801-808
- Marsh, A., Spurdle, A., B., Turner, B., C., Fereday, S., Thorne, H., Pupo, G., M., Mann, G., J., Hopper, J., L., Sambrook, J., F., Chenevix-Trench, G., 2001. " The intronic G13964C variant in p53 is not a high-risk mutation in familial breast cancer in Australia", *Breast Cancer Res.*, April, Vol. 3, pp. 346-349.
- Mattar, R., Alexandrine, A. M., and Laudanna, A. A., 1999, "Infrequent p53 gene alterations in ulcerative colitis", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, November, Vol. 32, pp. 1083-1088.
- Miyaki, M., Lijima, T., Ishii, R., Kita, Y., Koike, M., Kuroki, T., and Mori, T., 2002, "increased frequency of p53 mutation in Sporadic Colorectal Cancer from Cigarette Smokers", *Jpn J. Clin. Oncol.*, April, vol. 32, 196-201.
- Miyaki, M., Lijima, T., Ohume, M., Kita, Y., Hishima, T., Kuroki, T., Iwama, T., and Mori, T., 2003, "A novel case with germline p53 gene mutation having concurrent multiple primary colon tumours", *Gut*, Vol. 52, pp. 304-306.
- Normand, G., Hemati, P., G., Verdood, B., Haefen, c., Wendt, J., Güner, D., May, E., Do"rken, B., Daniel, P., T., 2004, "p14ARF Induces G₂ Cell Cycle Arrest in p53- and p21-deficient Cells by Down-regulating p34^{cdc2} Kinase Activity", *JBC*, November, Vol. 280, pp. 7118-7130.
- Nussbaum, R., L., McInnes, R., R., Willard, H., F., Boerkoel, C., F., 2005, "Tıbbi Genetik", Güneş, Bölüm 6, Türkiye, syf 311-312.
- Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L., Vogelstein, B., 1992, " Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas", *Nature*, Vol. 358, pp. 80-83.
- Öner, C., 2003, "Genetik Kavramlar", Palme, Bölüm 23, Türkiye, syf 635-636.
- Özdamar, K, 1997, "Biyostatistik ve Bilgisayar", Anadolu Üniversitesi Web-Ofset, Bölüm 12, Türkiye, syf 193-194.
- Pearson, P., L., Lujt, V., 1998, "The genetic analysis of cancer", *Journal of Internal Medicine*, January, Vol. 243, pp. 413-417.

- Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Velazquez, A., and Perucho, M., 1992, "Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, November, Vol. 89, pp. 10065-10069.
- Pérez, L.O., Abba, M.C., Dulout, F.N., Golijow, C.D., 2006, "Evaluation of p53 codon 72 polymorphism in adenocarcinomas of the colon and rectum in La Plata, Argentina", *World Journal of Gastroenterology*, March, Vol. 12(9), 1426-1429.
- Pietenpol, J., A., Lengauer, C., Jordan, J., Kinzler, K., W., and Vogelstein, B., 1996, "Mammalian cells resistant to tumor suppressor genes", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, August, Vol. 93, pp. 8390-8394.
- Rashid, A., Zahurak, M., Goodman, S.N., and Hamilton, S.R., 1999, "Genetic epidemiology of mutated K-ras proto-oncogene, altered suppressor genes, and microsatellite instability in colorectal adenomas", *Gut*, January, Vol. 44, pp. 826-833.
- RØtterud, R., Berner, A., Holm, R., Skovlund, E., and Fosså, S.D., 2001, "p53, p21 and mdm2 expression vs the response to radiotherapy in transitional cell carcinoma of the bladder", *BJU International*, April, Vol. 88, pp. 202-208.
- Rupnarain, C., Dlamini, Z., Naicker, S., ve Bhoola, K., 2004, "Colon cancer: genomics and apoptotic events", *Biol. Chem.*, June, Vol. 385, pp. 449-464.
- Scheider-Stock, R., Boltze, C., Peters, B., Szibor, R., Landt, O., Meyer, F., 2004, "Selective Loss of Codon 72 Proline p53 and Frequent Mutational Inactivation of the Retained Arginine Allele in Colorectal Cancer", *Neoplasia*, September/October, Vol. 6, pp. 529-535.
- Silverberg, S., G., 1970, "Focally malignant adenomatous polyps of the colon and rectum", *Surg. Gynecol. Obstet*, Vol. 131, pp. 103-104.
- Sevignani, C., Cranston, A., Iozzo, R., v., Fishel, R., and Calabretta, B., 1999, "Spontaneous and Mutagen-induced Transformation of Primary Cultures of Msh-2-/-p53-/-Colonocytes", *CANCER RESEARCH*, December, Vol. 59, pp. 5882-5886.
- Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B., and Costa, J., 1992, "Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, May, Vol. 89, pp. 4495-4499.
- Sheikh, R.A., Yasmeen, S., Prindiville, T., 2002, "Biological Markers and Colorectal Cancer", *JK-Practitioner*, October-December, Vol. 9, pp. 215-218.

- Shieh, S., Y., Ikeda, M., Taya, Y., Prives, C., 1997, "DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2", *Cell*, Vol. 91, pp. 325-334.
- Slattery, M.L., Curtin, K., Ma, K., Edwards, S., Schaffer, D., Anderson, K., and Samowitz, W., 2002, "Diet, Activity, and Lifestyle Associations with p53 Mutations in Colon Tumours", *Cancer Epidemiology, Biomarkers&Prevention*, June, vol. 11, pp. 541-548.
- Smith G.A, Oien K.A, O'Dwyer P.J., 1999, "Frequency of early colorectal cancer in patients undergoing colonoscopy". *Br J Surg*, 86, 1328-31.
- Smith, G., Carey, F.A., Beattie, J., Wilkie, M.J.V., Lightfoot, T.j., Coxhead, J., Garner, R.C., Steele, R.J.C., and Wolf, C.R., 2002, "Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer", *PNAS*, November, Vol. 99, pp. 9433-9438.
- Szymańska, K., and Hainaut, P., 2003, "TP53 and mutations in human cancer", *Acta Biochimica Polonica*, February, Vol. 50, pp. 231-238.
- Tanaka S, Haruma K, Oka S. et al. Clinicopathologic features and endoscopic treatment of superficially spreading colorectal neoplasms larger than 20 mm. *Gastrointest Endosc* 2001, 54: 62-6.
- Temizkan, G., Arda, N., 2004, "Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler", *Nobel, Bölüm 5, Türkiye*, syf 107.
- Tsongalis, G., J., Coleman, W., B., 1998, "Molecular oncology : diagnostic and prognostic asesment of human cancers in the clinical laboraty", *Cancer Invest.*, April, Vol. 16pp. 485-502.
- Uchida, H., Ando, H., Maruyama, K., Kobayashi, H., toda, H., Ogawa, h., Ozawa, T., Matsuda, Y., Sugimura, H., kano, T., and Baba, S., 1998, "Genetic Alterations of Mixed Hyperplastic Adenomatous Polyps in the colon and Rectum", *Jpn. J. Cancer Res.*, March, Vol. 89, pp. 299-306.
- Vogelstein, B., Kinzler, K. W., 1992, "p53 function and dysfunction", *Cell*, Vol. 70, pp. 523-526.
- Wang, P., Reed, M., Wang, Y., Mayr, G., Stenger, J., E., Anderson, M., E., Schwedes, J., F., and Tegtmeyer, P., 1994, "p53 Domains: Structure, Oligomerization, and Transformation", *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, Aug., Vol. 14, pp. 5182-5191.
- Ward, E., Cokkinides, V., Jemal, A., Samuels, A., 2005, "Colorectal Cancer facts& Figures", *American Cancer Society*, 1-19.

- Warren, A., J., Shields, P., G., 1997, "Molecular epidemiology: carcinogen-DNA adducts and genetic susceptibility, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., December, Vol. 216, pp. 172-180.
- Weinberg, R.A., 1991, "Tumor supressor genes", Science, Vol. 254, pp. 1138-1146.
- Wyllie, A., H., 1997, "Apoptosis and carcinogenesis", Eur J Cell Biol., December, Vol 73, pp. 189-197.
- Xiao-Mou, P., Wen-Wei, P., Ji-Lu, Yao, 1998, "Codon 249 mutations of p53 gene in development of hepatocellular carcinoma", WJG, August, Vol. 4, pp. 125-127.
- Yamada, S., Ajioka, Y., Watanabe, H., Hashidate, H., Takaku, H., Kazama, S., Yokoyama, J., Nishikura, K., Fujiwara, T., and Asakura, H., 2001, "Heterogeneity of p53 Mutational Status in Intramucosal carcinoma of the Colorectum", Jpn. J. Cancer Res., February, Vol. 92, pp. 161-166.
- Yasumoto, J., Imai, Y., Takahashi, A., Ohnishi, K., Yuki, K., Kirita, T., and Ohnishi, T., 2003, "Analysis of Apoptosis-related Gene Expression after X-ray Irradiation in Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cells Harboring Wild-type or Mutated p53 Gene", J. RADIAT. RES., Vol. 44, pp. 41-45.
- Yeatman, T., J., 20003, "Beyond p53", Annals of Surgical Oncology, August, Vol. 10, pp. 831.
- Zambetti, G., P., and Levine, A., J., 1993, "A comparison of the biological activites of wild-type and mutant p53", The FASEB Journal, July, Vol. 7, pp. 855-865.
- Zhu, Z., Z., Cong, W., M., Liu, S., F., Dong, H., Zhu, G., S., Wu, M., C., 2005, "Homozygosity for Pro of p53 Arg72Pro as a potential risk factor for hepatocellular carcinoma in Chinese population", World of Gastroenterol, April, Vol. 11, pp. 289-292.

İNTERNET KAYNAKLARI

1. <http://catalog.nucleusinc.com/imagescooked/4748W.jpg> (5.06.2006)
2. www.hematology.im.wustl.edu/conferences/presentations/druley022406.ppt (1.06.2006)
3. http://jeffline.tju.edu/Education/NU570/library/lectures/images/gi_6.jpg (13.06.2006)
4. <http://tpmd.nhri.org.tw> (3.06.2006)
5. <http://www3.cancer.gov/legis/images/mutations.gif> (3.06.2006)
6. <http://ymghealthinfo.org/content.asp?pageid=P07205> (1.06.2006)
7. <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.19.11.oncogenes.jpg> (28.05.2006)
8. <http://www-p53.iarc.fr> (1.06.2006)
9. <http://www.cancer.org> (5.06.2006)
10. www.pleasanton.k12.ca.us/.../description.html (4.06.2006)
11. <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/Media/CDR0000415500.jpg> (3.06.2006)
12. <http://www.biolcell.org/boc/097/0185/boc0970185f03.gif> (1.06.2006)
13. http://jeffline.tju.edu/Education/dl/NU570/library/lectures/images/gi_6.jpg (13.06.2006)
14. <http://www.path.cam.ac.uk/~pawefish/ColonImagesAndCGH/SW480cl2webadj.gif> (15.05.2006)
15. <http://www.turkcancer.org/terr.php> (16.06.2006)
16. <http://www.path.cam.ac.uk/~pawefish/ColonImagesAndCGH/SW480cl2webif> (4.06.2006)
17. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/ColonCancer.gif> (5.06.2006)
18. <http://www.pearsoned.co.uk/Imprints/BenjaminCummings> (30.05.2006)
19. www.upmccancercenters.com/.../cancer.cfm?id=52 (30.05.2006)
20. http://p53.free.fr/p53_Info/gene/p53GENE.html (4.05.2006)
21. www.netterimages.com/image/list.htm?s=%22Gluc... (13.06.2006)
22. <http://www.portfolio.mvm.ed.ac.uk/studentwebs/session2/group28/p53.html> (16.06.2006)
23. http://www.hopkins-gi.org/images/shared/disease/database/shared_2222_NH-05.jpg (30.05.2006)
24. <http://www.weizmann.ac.il/mcb/MosheOren/mdm2.html> (16.06.2006)
25. www.netterimages.com/image/list.htm?s=%22Gluc... (1.06.2006)
26. <http://www3.cancer.gov/legis/images/mutations.gif> (20.06.2006)
27. http://p53.free.fr/p53_Info/gene/p53GENE.html (4.05.2006)
28. <http://www-p53.iarc.fr> (30.05.2006)
29. www.wellesley.edu/.../cancer/cancer.html (13.06.2006)
30. <http://p53.bii.a-star.edu.sg/images/common/aboutp53/simpleDNA.png> (13.06.2006)
31. http://p53.free.fr/p53_Info/gene/p53GENE.html (4.05.2006)
32. <http://www.pitt.edu/~heh1/> (20.06.2006)
33. http://www.google.com.tr/search?q=kanser+onkogenler&hl=tr&lr=lang_tr&start=40&sa=N (13.06.2006)

TEŞEKKÜR

Moleküler Tıp Derneği'nin Dzenlediği 1.Ulusal Moleküler Tıp Kongresi'ne katılmamda yardımlarını esirgemeyen, yüksek lisans tez konusu seçiminde beni yönlendiren, tez aşamasında bana sunmuş olduğu imkanlardan dolayı değerli tez hocam Yrd.Doç.Dr. Serap TUTGUN ONRAT'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteğini esirgemeyip, özellikle yüksek lisans tez döneminde sürekli yanımda olduklarından dolayı annem, babam ve kardeşlerime teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Emine Durhan 24.05.1980 tarihinde Afyon Çay ilçesinde doğmuştur.

1986-1991 Seka İlkokul

1991-1994 Çay Lisesi

1994-1998 Üsküdar Kız Lisesi

2000-2004 Afyon Kocatepe Üniversitesi (Derecesi: 2.92)

Emine DURHAN Yaz stajlarını 2003 yaz döneminde AKÜ Araştırma Uygulama Hastanesi Tıbbi Genetik ve Mikrobiyoloji laboratuvarlarında yine aynı Eylül ayında Afyon Devlet Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarında gerçekleştirmiştir. Emine DURHAN orta seviyede İngilizce bilmektedir.

Yayımları;

1-Onrat T.,S., Ellidokuz E., Küpelioğlu A., Durhan E., “p53 and APC gene mutation analyses in cases with colon cancer”, 7th Balkan Meeting on Human Genetics BMG 2006, Skopje Republic of Macedonia., August 31st-September 2nd 2006.

2-Onrat T.,S., Ellidokuz E., Küpelioğlu A., Durhan E., “Gene Mutation analyses of p53 Arg72Pro in cases with colon cancer”, 7th Balkan Meeting on Human Genetics BMG 2006, Skopje Republic of Macedonia., August 31st-September 2nd 2006.

3-Onrat T.,S., Ellidokuz E., Küpelioğlu A., Durhan E., “APC gene mutation analyses in cases with colon cancer”, 7th Balkan Meeting on Human Genetics BMG 2006, Skopje Republic of Macedonia, August 31st-September 2nd 2006

4-Onrat T.,S., Ellidokuz E., Küpelioğlu A., Durhan E., “p53 intronic variant G13964C analyses in cases with colon cancer”, 7th Balkan Meeting on Human Genetics BMG 2006, Skopje Republic of Macedonia, August 31st-September 2nd 2006.

Emine DURHAN Moleküler Tıp Derneğinin düzenlediği 1.Ulusal Moleküler Tıp Kongresi kapsamında Reprodüktif Tıp ve Real –time Klinik Uygulama Kursu, Proteomik Kursu sertifikalarına sahiptir.

İKADA İnsan Kaynakları Danışmanlığının düzenlediği Etkili ve Düzgün Konuşma, Kırmızı Danışmanlığının düzenlediği NLP ve Değişim Yönetimi, Hedef Belirleme ve Zaman Yönetimi sertifikalarına sahiptir.