

**GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA 12q13-24  
BÖLGESİNDEKİ HETEROZİGOTLUK KAYBININ  
ARAŞTIRILMASI**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ  
DOKTORA TEZİ**

**TÜRKAN AYTEKİN  
Nisan 2010**

T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: Kolorektal Kanserli Hastalarda 12q13-24 Bölgesindeki Heterozigotluk  
Kaybının Araştırılması

Öğrencinin, Adı Soyadı: Türkan AYTEKİN

Tez Savunma Tarihi:02/ 04/ 2010

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof.Dr.Ramazan KOÇ

FBE Müdürü

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylıyorum.

Prof.Dr.Mehmet ÖZASLAN

Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Celalettin CAMCI  
İkinci Tez Danışmanı

Prof.Dr.Mehmet ÖZASLAN  
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

İmzası

Prof.Dr.Mehmet ÖZASLAN

\_\_\_\_\_

Prof.Dr.Mustafa CANLI

\_\_\_\_\_

Prof.Dr.Şükran YAĞCI YÜCEL

\_\_\_\_\_

Doç.Dr.Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

\_\_\_\_\_

Yrd.Doç.Dr.Beyhan CENGİZ

\_\_\_\_\_

## ÖZET

### KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA 12q13–24 BÖLGESİNDEKİ HETEROZİGOTLUK KAYBININ ARAŞTIRILMASI

**AYTEKİN Türkan**

**Doktora Tezi, Biyoloji Bölümü**

**Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN**

**Yrd. Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Celalettin CAMCI**

**Nisan 2010, 82 sayfa**

Kolorektal kanserler dünyada en sık görülen kanserler arasında yer almaktadır. Kolorektal kanser çok basamaklı ve uzun bir karsinogenez aşamasından sonra oluşmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu kolorektal kanserlerde en önemli basamaklardan birisidir. Heterozigotluk kaybı (LOH) analizleri tümör baskılayıcı genlerin lokalizasyonunu belirlemede kullanılan etkili bir metottur. Bu çalışmada 47 kolorektal kanserli hastanın normal ve tümörlü dokularında 5 mikrosatellit markır kullanılarak kromozom 12q13–24 bölgesindeki LOH araştırıldı. LOH sıklığı ile klinik-patolojik veriler, lojistik regresyon ve  $\chi^2$  analizleri ile kıyaslandı. 47 tümör dokusunun 34'ünde (% 72,3) en az bir markırda LOH saptandı. En yüksek LOH frekansı % 34,3 ile D12S129 lokusunda, en düşük LOH frekansı ise %23,3 ile D12S78 lokusunda saptandı. D12S83 lokusunda % 31,5, D12S346 lokusunda % 29,6 ve D12S1660 lokusunda da % 25,5 oranında LOH tespit edildi. LOH sıklığı ile klinik-patolojik veriler arasında anlamlı ilişki saptanmadı ( $p>0,05$ ). Kromozom 12q13–24 bölgesi tümör baskılayıcı gen olabilecek birkaç aday gen (*RASAL1*, *ITGA7*, *STAB2*, *GLIPR1* ve *SLC5A8*) içermektedir. Bu genlerin kolorektal kanser oluşumundaki kesin rolleri bundan sonra yapılacak çalışmalar ile ortaya konabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Kolorektal kanser, heterozigotluk kaybı (LOH), tümör baskılayıcı gen, 12q13–24

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF LOSS OF HETEROZYGOSITY ON 12q13-24 REGION IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

AYTEKİN, Türkan

Ph.D. in Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Co-supervisor: Prof. Dr. Celalettin CAMCI

April 2010, 82 pages

Colorectal cancer is one of the most common cancers in the world. Colorectal cancer develops after a long and multistep carcinogenesis process. Inactivation of tumor suppressor genes is one of the most important steps in development of colorectal cancer. Loss of heterozygosity (LOH) analysis is an effective method that is frequently used to determine the localization of the tumor suppressor genes. In this study, we analyzed chromosome 12q13-24 region among 47 patients with colorectal cancer by using 5 microsatellite markers. The frequency of LOH and the clinicopathological data were compared with logistic regression and  $\chi^2$  test. In 34 of 47 tumor tissues (72,3%), LOH was detected at least in one marker. The highest LOH frequency was 34,3% on D12S129 locus, and the lowest frequency was 23,3% on D12S78 locus. LOH was detected as 31,5% on D12S83 locus, 29,6% on D12S346 locus and 25,5% on D12S1660 locus. No statistically significant correlation was found between the frequency of LOH and clinicopathological features ( $p > 0,05$ ). Chromosome 12q13-24 region contains a few known genes (*RASALI*, *ITGA7*, *STAB2*, *GLIPR1* and *SLC5A8*) that may be candidate tumor suppressor genes. Precise roles of these genes in colorectal cancer formation will be clarified by later studies.

**Key Words:** Colorectal cancer, loss of heterozygosity, tumor suppressor gene, 12q13-24

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, sahip olduğu bilgi birikimi ve görüşleriyle beni yönlendiren, ihtiyacım olduğu her an desteğini yanımda hissettiğim değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof.Dr.Mehmet ÖZASLAN'a;

Tez çalışmalarım esnasında gösterdiği ilgi, destek ve değerli katkılarından dolayı değerli hocam Sayın Prof.Dr.Celalettin CAMCI'ya;

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, çalışmamın planlanmasında büyük emeği geçen Sayın Yrd.Doç.Dr. Beyhan CENGİZ'e;

Çalışmalarım için laboratuvarlarının tüm imkanlarını kullanımına sunan Sayın Prof.Dr.Ahmet ASLAN'a;

Çalışmalarım esnasında her zaman manevi desteği ile yanımda olan Sayın Prof.Dr.Şükran YAĞCI YÜCEL'e;

Tez çalışmalarım boyunca benden yardımlarını ve önerilerini esirgemeyen Sayın Doç.Dr.Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER'e;

Çalışma materyallerinin temini sağlayan ve örneklerin patolojik değerlendirmesini yapan Sayın Prof.Dr.Yücel GÜNGEN'e, Okay ERİŞÖZ'e ve Ankara Genel Patoloji Merkezi çalışanlarına;

Tez çalışmamın istatistiksel verilerinin değerlendirilmesinde yardımcı olan Sayın Yrd.Doç.Dr.Seval KUL'a;

Laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını gördüğüm Sayın Ayşe KIZILYER'e, Mehri İĞCİ'ye, İbrahim Halil YILDIRIM'a ve Yusuf İĞCİ'ye;

Tez yazımda yardımcı olan Arş.Gör. Fatih YAYLA'ya;

Her zaman yanımda olan ve hayatım boyunca güven ve desteklerini hiç esirgemeyen AİLEM'e;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Kanserin Moleküler Temeli.....	4
2.2 Kolorektal Kanseri.....	8
2.2.1 Kolorektum Anatomisi.....	8
2.2.2 Kolorektum Histolojisi.....	10
2.2.3 Kolorektal Kanseri Epidemiyolojisi.....	11
2.2.4 Kolorektal Kanseri Gelişiminde Etkili Olan Risk Faktörleri.....	12
2.2.5 Kolorektal Kanseri Yayılımı.....	14
2.2.6 Kolorektal Kanseri Evrelendirilmesi.....	15
2.2.6.1 TNM Derecelendirme Sistemi.....	16
2.2.6.2 Evre Gruplaması.....	17
2.2.7 Kolorektal Kanseri Gözlenen Önemli Genetik Değişiklikler.....	18
2.2.8 Kolorektal Kanseri Sınıflandırılması.....	3
2.2.8.1 Ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP) .....	23

2.2.8.2 Kalıtsal Polipsiz Kolorektal Kanser (HNPCC- Herediter Non-Poliposis Colorectal Cancer-Lynch Sendromu) .....	24
2.2.8.3 Sporadik Kolorektal Kanser .....	26
2.2.8.4 Ailesel Kolorektal Kanser .....	27
2.3 Heterozigotluk Kaybı (LOH) .....	27
2.3.1 Heterozigotluk Kaybının (LOH) Mekanizmaları .....	29
2.3.2 LOH Analizinde Kullanılan Metotlar .....	29
2.3.2.1 Mikrosatellit Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	29
2.3.2.2 Karyotip Analizi .....	30
2.3.2.3 Floresans <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH) .....	31
2.3.2.4 Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Analizi .....	31
2.3.2.5 Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP) .....	31
2.4 Kaynak Özetleri .....	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	36
3.1 MATERYAL .....	36
3.1.1 Doku Örneklerinin Elde Edilmesi .....	36
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar .....	38
3.1.3 Kullanılan Cihazlar .....	39
3.1.4 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler .....	39
3.2 YÖNTEM .....	42
3.2.1 DNA İzolasyonu .....	42
3.2.2 Spektrofotometrik Analiz .....	44
3.2.3 Kromozom 12q13-24 Üzerinde Heterozigotluk Kaybının (LOH) Araştırılması .....	44
3.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi .....	45
3.2.5 Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....	45

3.2.5.1 Camların Hazırlanması.....	45
3.2.5.2 Jelin Hazırlanması.....	46
3.2.5.3 Örneklerin Hazırlanması.....	46
3.2.5.4 Örneklerin Jele Yüklenmesi.....	46
3.2.6 Gümüş Boyama Yöntemi.....	46
3.2.7 Sonuçların Değerlendirilmesi.....	47
3.2.8 Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	48
4. BULGULAR.....	49
4.1 İzole Edilen DNA'ların Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları.....	49
4.2 D12S83, D12S1660, D12S346, D12S78 ve D12S129 Markırlarına Özgül Primerler Kullanılarak Gerçekleştirilen PCR Sonuçları.....	51
4.3 Heterozigotluk Kaybıyla (LOH) İlişkili Bulgular.....	53
4.3.1 D12S83 Markır Bulguları.....	53
4.3.2 D12S1660 Markır Bulguları.....	55
4.3.3 D12S346 Markır Bulguları.....	57
4.3.4 D12S78 Markır Bulguları.....	59
4.3.5 D12S129 Markır Bulguları.....	61
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65
6. KAYNAKLAR.....	69
7. ÖZGEÇMİŞ.....	81



## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 2.1</b> Kalın barsağın başlıca bölümleri.....	10
<b>Şekil 2.2</b> Kolorektal kanser oluşumunda genetik bir model.....	19
<b>Şekil 2.3</b> Tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunda rol oynayan Knudson'ın iki vuruş hipotezi.....	28
<b>Şekil 2.4</b> Mikrosatellit PCR sonrası kapiller elektroforez analizindeki heterozigotluk kaybının görüntüsü.....	30
<b>Şekil 2.5</b> Mikrosatellit PCR sonrası jel elektroforez analizindeki heterozigotluk kaybının görüntüsü.....	30
<b>Şekil 4.1</b> D12S83 bölgesinin PCR'ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	51
<b>Şekil 4.2</b> D12S1660 bölgesinin PCR'ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	51
<b>Şekil 4.3</b> D12S346 bölgesinin PCR'ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	52
<b>Şekil 4.4</b> D12S78 bölgesinin PCR'ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	52
<b>Şekil 4.5</b> D12S129 bölgesinin PCR'ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	53
<b>Şekil 4.6</b> D12S83 markır bölgesinde LOH (2 numaralı örnek) (a), heterozigotluk (5 numaralı örnek) (b) ve homozigotluk (19 numaralı örnek) (c) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri.....	54
<b>Şekil 4.7</b> A. 19 numaralı örnekte D12S83 bölgesinde gözlenen homozigot profili, B. 1 numaralı örnekte D12S83 bölgesinde gözlenen heterozigot profili, C. 22 numaralı örnekte D12S83 bölgesinde gözlenen LOH profili.....	54

<b>Şekil 4.8</b> D12S1660 markır bölgesinde LOH (28 numaralı örnek) (a), heterozigotluk (25 numaralı örnek) (b) ve homozigotluk (31 numaralı örnek) (c) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri.....	56
<b>Şekil 4.9</b> D12S346 markır bölgesinde LOH (1 numaralı örnek) (a), heterozigotluk (2 numaralı örnek) (b) ve homozigotluk (5 numaralı örnek) (c) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri.....	57
<b>Şekil 4.10</b> 1 numaralı örnekte D12S346 bölgesinde gözlenen LOH profili.....	58
<b>Şekil 4.11</b> D12S78 markır bölgesinde LOH (17 numaralı örnek) (a), heterozigotluk (32 numaralı örnek) (b) ve homozigotluk (35 numaralı örnek) (c) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri.....	59
<b>Şekil 4.12</b> D12S129 markır bölgesinde LOH (15 numaralı örnek) (a), heterozigotluk (1 numaralı örnek) (b) ve homozigotluk (11 numaralı örnek) (c) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri.....	61
<b>Şekil 4.13</b> 15 numaralı örnekte D12S129 bölgesinde gözlenen LOH profili.....	61
<b>Şekil 4.14</b> Kolorektal kanserli hastalarda her bir markırda tespit edilen sonuçlar....	63
<b>Şekil 4.15</b> LOH dağılımının grafiksel olarak gösterimi.....	63
<b>Şekil 4.16</b> 12q13-24 kromozom bölgesinde bulunan markırların ve genlerin yerlerini gösteren harita.....	64

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1</b> Kolorektal kanser gelişiminde etkili olan risk faktörleri.....	13
<b>Tablo 2.2</b> HNPCC ile ilişkili kanserlerin oluşma riskleri.....	25
<b>Tablo 3.1</b> Kolorektal kanser tanısı konmuş hastalara ait örnek numaraları, cinsiyet, yaş, örneğin alındığı yer ve patolojik evre bilgileri.....	37
<b>Tablo 3.2</b> Hastalara ait özelliklerin genel dağılımı.....	38
<b>Tablo 3.3</b> Standart olarak kullanılan bir PCR örneği.....	44
<b>Tablo 3.4</b> D12S83, D12S1660, D12S346, D12S78 ve D12S129 polimorfik bölgelerini çoğaltmak için kullanılan PCR döngüsü.....	45
<b>Tablo 4.1</b> Kolorektal kanserli hastalara ait normal (N) ve tümörlü (T) dokulardan elde edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçüm sonuçları.....	50
<b>Tablo 4.2</b> D12S83 markırında gözlenen LOH ile hastaların yaşı, cinsiyeti ve hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki.....	55
<b>Tablo 4.3</b> D12S83 markırında gözlenen LOH ile örneğin alındığı yer arasındaki istatistiksel ilişki.....	55
<b>Tablo 4.4</b> D12S1660 markırında gözlenen LOH ile hastaların yaşı, cinsiyeti ve hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki.....	56
<b>Tablo 4.5</b> D12S1660 markırında gözlenen LOH ile örneğin alındığı yer arasındaki istatistiksel ilişki.....	57
<b>Tablo 4.6</b> D12S346 markırında gözlenen LOH ile hastaların yaşı, cinsiyeti ve hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki.....	58
<b>Tablo 4.7</b> D12S346 markırında gözlenen LOH ile örneğin alındığı yer arasındaki istatistiksel ilişki.....	59
<b>Tablo 4.8</b> D12S78 markırında gözlenen LOH ile hastaların yaşı, cinsiyeti ve hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki.....	60

<b>Tablo 4.9</b> D12S78 markırında gözlenen LOH ile örneğin alındığı yer arasındaki istatistiksel ilişki.....	60
<b>Tablo 4.10</b> D12S129 markırında gözlenen LOH ile hastaların yaşı ve cinsiyeti arasındaki istatistiksel ilişki.....	62
<b>Tablo 4.11</b> D12S129 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki.....	62
<b>Tablo 4.12</b> D12S129 markırında gözlenen LOH ile örneğin alındığı yer arasındaki istatistiksel ilişki.....	62

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AFAP	: Atenüe Ailesel Adenomatöz Polipozis
AgNO <sub>3</sub>	: Gümüş nitrat
APC	: Adenomatöz polipozis koli
APS	: Amonyum persülfat
bç	: Baz çifti
<sup>0</sup> C	: Santigrad derece
Ca	: Kalsiyum
CGH	: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
dH <sub>2</sub> O	: Distile su
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü
FAP	: Ailesel Adenomatöz Polipozis
FISH	: Floresans <i>in situ</i> Hibridizasyon
FJP	: Ailesel juvenil polipozis
g	: Gram
GA	: Güven aralığı
GTP	: Guanozin trifosfat
GST- <i>pi</i>	: Glutatyon-S-transferaz- <i>pi</i>
HBV	: Hepatit B virüsü
HNPCC	: Kalıtsal Polipsiz Kolorektal Kanser
l	: Litre
LOH	: Heterozigotluk kaybı
mg	: Miligram

ml	: Mililitre
MSI	: Mikrosatellit kararsızlık
$\mu$ l	: Mikrolitre
$\mu$ M	: Mikro molar
ng	: Nanogram
OD	: Optik dansite
<i>PCNA</i>	: Proliferatif hücre çekirdek antijeni
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>PTPRJ</i>	: Protein tirozin fosfotaz reseptör tip J
RE	: Restriksiyon Endonükleaz enzimleri
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm Analizi
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SNP	: Tek nükleotid Polimorfizmi
SSCP	: Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TEMED	: Tetrametiletildiamin
<i>TGF<math>\alpha</math></i>	: Tümör büyüme faktör reseptörü $\alpha$
<i>TGF<math>\beta</math></i>	: Tümör büyüme faktör reseptörü $\beta$
TNM	: Tümör, Node, Metastaz
UV	: Ultra viyole
V	: Volt
<i>VEGF</i>	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
%	: Yüzde

## 1. GİRİŞ

Moleküler biyoloji alanındaki teknolojik gelişmelere paralel olarak, karsinogenez sürecinde işlevsel olan biyolojik markırların bulunuşu kanserin anlaşılmasına ve hastaların klinik ve patolojik evrelendirilmesine yardımcı olmaktadır. Günümüzde kolorektal kanserlerdeki genetik değişimlerin tanımlanmasına yönelik çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir. Bu araştırmaların en önemli amacı, kolorektal tümör patogenezinde rol alan özgül genetik değişikliklerin biyolojik etkilerinin belirlenmesi ve bu yolla kanser gelişiminin önlenmesi ile tanı ve tedaviye yönelik yeni yaklaşımların geliştirilmesidir (Ponz de Leon ve Di Gregorio, 2001; Ay, 2005).

Kolorektal kanserler dünyada olduğu gibi ülkemizde de sık görülen malign tümörlerdir (Büyükdoğan, 2009). Dünya genelinde en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden birini oluşturmaktadır. Her iki cinsiyette de en sık görülen kanserler içinde üçüncü sırada yer almaktadır (Souglakos, 2007). Bu kanser türü çok aşamalı ve uzun bir karsinogenez aşamasından sonra oluşmaktadır. Kolorektal kanser gelişim süreci ile *K-ras*, *APC*, *p53* ve *DCC* gibi tümör baskılayıcı gen ve onkogenler ilişkili bulunan ilk genler olmuştur. Daha sonraki çalışmalarda apoptoz genleri (*BCL-2*, *BAX*), DNA sentez genleri (*timidilat sentetaz*, *timidin fosfataz*) ile büyüme faktörü ve büyüme faktörü reseptör genlerinin (*TGF $\alpha$* , *TGF $\beta$* , *HER-2/neu*, *EGFR*) etkili olduğu belirlenmiştir. *MSH2* ve *MLH1* gibi DNA yanlış eşleşme tamir genlerinin de kolorektal kanserlerde sıklıkla metilasyona uğradığı ve bu şekilde kanser gelişiminde rol oynadıkları ortaya konulmuştur (Weitz vd., 2005).

Kolorektal kanserin genetiği ile ilgili çalışmalar, anjiogenezle ilgili genlerin (*VEGF*) tümör oluşumunda etkili olduğunun tespit edilmesi ile daha da ivme kazanmıştır. Hücre içi sinyal iletiminde etkili olan siklin ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin (*p27*, *p21*, *p16*), hücre-hücre etkileşimlerinde rol alan adezyon molekülleri ve glikoprotein genleri (*cd44*, *E-kaderin*, *ICAM-1*) ile invazyon markırlarının (*matriks metalloproteinazlar*, *ürokinaz tip plazminojen aktivatörü*) da ilişkili olduğu saptanmıştır. Bunlarla beraber proliferasyon uyarıcı genler (*Ki-67*, *Mib-1*, *Proliferating Cell Nuclear Antigen-PCNA*), antioksidanlar (*Süperoksit dismutaz*,

*GST-pi (Glutasyon-S-transferaz-pi)*) ve telomer uzunluğu gibi değişimi saptanan diğer moleküler markırlar da tespit edilmiştir (Weitz vd., 2005).

Kanserin çok sayıdaki kromozom ve genlerdeki genetik değişikliklerin birikmesi sonucunda oluştuğu bilinmektedir (etin vd., 2008; Velasco vd., 2008). Genetik değişiklikler arasında tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu kritik basamaklardan birini oluşturmaktadır. Knudson'ın klasik “ift vuruş” hipotezine göre, tümör baskılayıcı genin her iki kopyasının kaybı, neoplastik hücrelerin gelişimi için gerekli normal hcreesel fonksiyonların kaybına neden olmaktadır (Knudson, 1971; Ross, 1998; Velasco vd., 2008). Çevresel etkenlere bağlı olarak kromozomun belirli bir bölgesindeki allelik kayıp bu bölgede bir tümör baskılayıcı genin varlığını işaret eder. LOH analizi informatif lokusların ve özellikle aday tümör baskılayıcı genlerin lokalizasyonunu belirlemede kullanılan etkili bir metottur (Knudson, 1971; Peng vd., 2003).

Kolorektal kanserlerle ilgili yapılan çalışmalarda 1p, 1q, 4q, 5q, 8p, 9q, 12p, 14q, 15q, 17p, 17q, 18p, 18q ve 22q gibi birçok farklı kromozom bölgesinde değişik oranlarda heterozigotluk kayıplarının olduğu bildirilmiştir (Choi vd., 2002; Popat vd., 2003; Zhou vd., 2004; Kapitanovic vd., 2004; Cacev vd., 2005; Zheng vd., 2005; Chang vd., 2005; Mao vd., 2006; Wan vd., 2006). Bu çalışmada 47 kolorektal kanser hastasından, cerrahi yöntemler ile elde edilen, 47 normal doku ve 47 tümör dokusunda kromozom 12q13–24 bölgesindeki LOH profilinin belirlenmesi ve aynı zamanda saptanan LOH ile klinik-patolojik bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olup olmadığının ortaya konması amaçlanmıştır. Elde edilen heterozigotluk kayıplarına paralel olarak hedef kromozom bölgesinde kolorektal kanserle ilişkili olabilecek aday tümör baskılayıcı genler saptanmış olacaktır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin bundan sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

Kanser dünya genelinde en önemli sağlık sorunlarından biri olma özelliğini korumaktadır. Bununla beraber son 30–35 yılda moleküler biyoloji alanında yapılan çalışmalar ile kanser biyolojisi hakkında bilinenler hızla artmaktadır. Hücre siklusu kontrol mekanizmalarının ve sinyal ileti yollarının aydınlatılması, DNA replikasyonu ve DNA tamir mekanizmaları ile kromozom organizasyon mekanizmalarının belirlenmesi, adhezyon, anjiyogenez ve apoptozun tümör oluşum sürecindeki etkilerinin saptanması, kanserin “genetik bir hastalık” olarak anlaşılmasını ve tanımlanmasını sağlamıştır. Gelişen teknolojik imkanlar ve insan genom projesinin tamamlanması ise kanser oluşumunda etkili olan genetik değişikliklerin saptanmasına yönelik çalışmalara ışık tutmaktadır. Son on yıl içinde, kanser oluşumunda etkisi olan çok sayıda gen tanımlanmıştır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonların kanser gelişimini tetiklediği saptanmıştır. Bugün; kanserin tek bir hücrede, genomik stabiliteyi sağlayan mekanizmalarda işlev gören proteinlerin kodlandığı genlerde, endojen ve/veya eksojen bir etken tarafından oluşturulan genetik değişimlerle tetiklendiği kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra, meydana gelen bu kritik genetik değişimlerin çok evreli bir süreçle hücrenin neoplastik karakter kazanmasına neden olduğu, ancak tümör hücre gruplarının oluşumunda ise meydana gelen genetik değişimin diğer hücrelere aktarılabilir olması gerektiği bilinmektedir (Institute of Medicine, 1992; Cowell, 2001; Ay, 2005).

Kanserin genetik bir hastalık olarak tanımlanması, tanı, prognoz ve tedaviye yönelik yaklaşımların yeniden gözden geçirilmesini gerektiren yeni bir açılıma neden olmuştur. Bu açılım çerçevesinde kanserin biyolojisini anlamaya yönelik çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir. Pek çok kanser tipi için, tanı kriterlerini, prognozu ve tedaviyi direkt olarak etkileyen pek çok genetik değişim tanımlanmış olmakla birlikte, kanserin çok evreli gelişim sürecinde, aydınlatılmayı bekleyen birçok nokta bulunmaktadır (Ay, 2005).

## 2.1 Kanserin Moleküler Temeli

Kanser, uzun bir zaman süreci içinde genetik materyalin hasara uğraması sonucu oluşan genetik bir hastalıktır. Bu süreçte onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen değişiklikler önemli bir yer tutmaktadır. Gerek hücresel gerekse de çevresel faktörler bu süreci doğrudan etkilemektedir (Akkiprik, 2005; Ekmekçi, 2006).

1970’li yıllarda kanserin kaynağını bulmaya yönelik çalışmalara hız verilmiş ve önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. X-ışınları ile sirke sineği üzerinde yapılan çalışmalar, sineğin genomunda genetik hasarların oluştuğunu göstererek karsinogenez ve mutagenез arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur (Sönmez, 2004; Akkiprik, 2005).

Mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi tüm kanserlerin ortak özelliği olarak kabul edilmektedir. Kanser çeşitlerinin çoğunda mutasyonlar somatik hücrelerde meydana gelir ve bu mutasyonlar üreme hücreleri ile gelecek nesillere aktarılamaz. Ancak, kanser vakalarının %1’inde, eşey-kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılır ve bu değişim, yeni neslin kansere yatkınlığını oluşturur (Klug ve Cummings, 2002).

İnsanlardaki kanserlerin büyük çoğunluğu dramatik olarak artmış bir mutasyon oranına sahiptir. Bu hücreler genetik olarak kararlı bir yapıya sahip değildir. Bu genomik kararsızlık çeşitli formlarda görülebilir. Bazı kanser hücreleri lokal DNA hasarını tanıma yeteneğinde ve/veya tek tek nükleotidleri etkileyen replikasyon hata onarımında kusurludur. Bu hücrelerde normal hücrelerde görülenden çok daha fazla sayıda nokta mutasyon ve küçük, lokalize dizi değişimleri vardır. Bazı diğer kanser hücrelerinde ise kromozom bütünlüğünün korunamaması sonucunda karyotiplerinde büyük bozukluklar saptanmaktadır. Genetik kararsızlığın kanser formasyonunu güçlendireceği olası bir beklentidir. Gerçekten de genetik kararsızlığın bazı dereceleri kanser gelişimi için temel oluşturmaktadır (Akkiprik, 2005).

Kansere yol açan mutajenler üç grup altında toplanır. Bunlar kimyasal karsinojenler (benzen, aminler vb.), fiziksel karsinojenler (iyonize edici radyasyon –X ışınları gibi) ve biyolojik karsinojenlerdir (virüsler-HBV gibi) (Akkiprik, 2005).

Karsinogenez, hücrelerde genetik veya epigenetik olaylar ile seçici bir büyüme avantajı kazanılması ve bunların klonal yayılımından başlayan çok basamaklı bir süreçtir. Karsinogenez; başlama, promosyon ve ilerleme, ve metastaz evrelerinden oluşur. Tümör başlaması karsinojenik ajanların direk DNA üzerine olan etkileri içermektedir. Terminal farklılaşma regülasyonunun bozulması, sitotoksositeye olan direnç ve büyüme kontrolündeki hatalar ile klonal yayılım gözlenmektedir. Bunlara aynı zamanda sinyal iletimini kontrol eden büyüme faktörleri de etki eder. Bunu progresif fenotipik değişimler ve genetik kararsızlık takip eder. Özellikle onkogen ve tümör baskılayıcı gen hataları belirleyici rol oynamaktadır. Bu genetik değişimler başlangıç hücrelerinin malign bir yapıya dönüşmelerine yol açmaktadır. Daha sonra tümör hücreleri damar ve lenf dolaşımına geçerek farklı dokulara yayılır ve metastatik kolonileri oluştururlar (Akkiprik, 2005).

Kanser rasgele ve seri halde meydana gelen genetik değişimlerin sonucunda meydana gelmektedir. Bu süreçte etkilenen iki önemli gen grubu ve kontrolsüz hücre proliferasyonundan invazivliğe doğru giden iki mutasyonel rota vardır. Bunlar tümörün karakteristiğidir. Bu iki rotada onkogenler ve tümör baskılayıcı genler belirleyici rol alırlar. İlki uyarıcı genin hiper aktivitesine yol açar. Bu tip mutasyonlar dominant etkilidir. Hücrenin iki gen kopyasından yalnız birinin değişimi yeterlidir ve değişen gen onkogen olarak adlandırılır. Normal allel ise proto-onkogendir. İkincisi ise inhibisyona neden olan tümör baskılayıcı genin inaktivasyonudur. Bu mutasyon tipi genellikle resesif etki gösterir. Hücredeki her iki kopyanın inaktif veya delesyonlu olması gerekmektedir (Akkiprik, 2005; Ekmekçi, 2006).

Onkogenlerin çoğu, hücre çoğalmasıyla ilgili metabolik sinyal yollarında gerekli proteinleri kodlayan genlerin, değişime uğramış formları olarak ortaya çıkmaktadır. Bu metabolik yolların normal, bozulmamış hücresel genleri “proto-onkogen” olarak adlandırılır. Proto-onkogenler; hücreye bölünme mesajını getiren büyüme faktörlerini, sinyale cevap olarak hücre bölünmesinde gerekli olan genlerin transkripsiyonunu başlatan transkripsiyon faktörlerini ve hücre bölünmesi için gerekli olan bazı proteinleri fosfatlayarak aktif hale gelmeleriyle sinyal iletilmesini sağlayan sinyal iletim proteinlerini kodlarlar. Proto-onkogenlerin rol oynadığı üç biyokimyasal mekanizma tanımlanmıştır. İlk mekanizma serin, treonin ve tirozinli substrat proteinlerinin fosforilasyonudur. Büyüme faktörleri bu etkiye neden olabilir.

Örneğin; serin/treonin protein kinazlar. İkinci mekanizma bu genlerin GTPaz'lar ile sinyal iletimidir ve bu konuda ilk olarak Ras proteinleri keşfedilmiştir. Üçüncü mekanizma ise transkripsiyondur, transkripsiyon faktörlerinin büyük bir çoğunluğu proto-onkogenler tarafından kodlanmaktadır (Sönmez, 2004).

Proto-onkogenleri onkogenlere dönüştüren çok sayıda mekanizma vardır. Bunlar; nokta mutasyonları, kromozomal translokasyonlar, gen duplikasyonu, insersiyonel mutasyonlar, retroviral transdüksiyon ya da retroviral integrasyon ve protein-protein etkileşimleridir (Ekmekçi, 2006).

Tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonunu gösteren ilk bulgular, Henry Harris ve arkadaşları tarafından 1969 yılında başlatılan, somatik hücre hibridizasyon deneyleri ile elde edilmiştir. Normal ve kanser hücreleri ile yapılan füzyon çalışmaları sonucunda hibrid hücrelerin çoğunlukla tümör oluşturma yeteneğine sahip olmadığı görülmüştür. Tümör hücre genomunda ise kritik bir lezyon olduğu ve bunun normal hücre büyümesinin negatif regülasyonundan sorumlu bir genin kaybı nedeniyle olduğu ortaya konmuştur. Bu gen, hücre füzyonu sonrası tümör hücre genomuna yeniden kazandırılmakta, sonuç olarak çoğunlukla normal büyümenin kontrolü restore edilmiş olmaktadır. Bu genler tümör baskılayıcı genler ya da anti-onkogenler olarak adlandırılmıştır. Tümör baskılayıcı genler adlarından da anlaşılacağı gibi hücre büyümesini düzenleyerek tümör gelişimini engelleyen genlerdir. Tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyon kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine, anormal hücre büyümesine ve defektif apoptozise neden olmaktadır (Akkiprik, 2005; Durhan, 2006; Cooper ve Hausman, 2006).

Tümör baskılayıcı genleri etkileyen kodlayıcı bölgedeki yanlış anlamlı mutasyonlar, proteinin büyüklüğünü ve aktivitesini değiştiren çeşitli eksilme, artma ya da çerçeve kaydıran mutasyonlar proteinlerin aktivitesini azaltır ya da tamamen ortadan kaldırır. Genin kontrol bölgelerini kapsayan mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler ise gen ifadesini azaltır ya da tamamen ortadan kaldırılabılır (Ekmekçi, 2006).

Tümör baskılayıcı genlerin kanser fenotipine yansımaları resesif etki ile olmaktadır. Diğer bir deyişle kanser gelişiminde rolü olması için her iki tümör baskılayıcı geninde inaktif olması gereklidir (Knudson'un "çift vuruş" hipotezidir). Çünkü normal bir genin varlığı baskılama işlevini yerine getirebilmektedir. Kalıtsal

kansere yatkınlık veren ve hücre döngüsünü, hücre apoptotik yolu ve DNA onarımını düzenleyen genlerden birisindeki mutasyon katılım yoluyla geçtiğinden, aynı hücrede bulunan diğer normal alleli için bir tek yeni mutasyon yeterlidir. Böylece heterozigot taşıyıcılarda normal tek seçenek şeklindeki allelin inaktivasyonu ile homozigosite (bir başka ifadeyle resesiflik ve etkisizlik) sağlanır. Kalıtsal olarak geçmese de aynı somatik hücrede her iki geninde mutasyona uğrama olasılığı vardır ancak çok düşüktür. Heterozigotluğu ortadan kaldıran (ya da homozigotluğu sağlayan); normal alleldeki nokta mutasyonu, kromozomal kayıplar, resesifliği sağlayan gen dönüşümü, kromozomal translokasyon ve normal allelin bulunduğu kromozomun tümüyle kaybolması gibi mutasyonel olaylardır (Ekmekçi, 2006).

Bir tek gende meydana gelen hata hücrelerin *in vivo* büyüme avantajı kazanma ve klonal yayılıma başlaması için yeterli değildir. Yapılan çalışmalarda kanser gelişimi için bir hücrede birbirinden bağımsız çeşitli kazaların bir arada olması gerektiği gösterilmiştir. Fare deneyleri tek bir onkogenin normal bir hücreyi kanser hücresine dönüştürmek için genellikle yeterli olmadığını ortaya koymuştur. *Myc* ve *Ras* onkogenlerini birlikte taşıyan farelerde kanser gelişim riski sadece bir onkogene oranla oldukça yüksektir. *In vivo* ve *in vitro* deneylerde iki ya da daha çok spesifik onkogenin sinerjistik rolü “onkogen işbirliği” olarak tanımlanmıştır (Akkiprik, 2005).

Hayvan virüs ailelerinde yer alan ve tümör virüsü adı verilen birçok virüs deney hayvanlarında veya insanda doğrudan tümör oluşturabilirler. İnsan kanserlerinin yaklaşık %15’inde virüsler etkili olmaktadır. İlk olarak 1910 yılında Rous adlı araştırmacı tarafından tavukta sarkomaya neden olan bir ajan tespit edilmiştir. Daha sonraki yıllarda da diğer araştırmacılar tarafından bu ajanın bir virüs olduğu bildirilmiştir. Günümüzde bu virüs Rous Sarkoma virüsü olarak bilinmekte ve retrovirüsler içerisinde yer almaktadır (Klug ve Cummings, 2002; Akkiprik, 2005).

Tek iplikli viral genoma sahip retrovirüsler revers transkriptaz enzimi ile DNA’ya transkribe olurlar. Viral DNA daha sonra kromozomal DNA’ya integre olur ve konak hücre, viral genleri kendisine aitmiş gibi eksprese eder. Bu senaryo kanser genlerinin ortaya çıkmasında iki ihtimali ortaya çıkarmaktadır. Bunlardan birincisi viral DNA entegrasyonunun potansiyel mutajenik etkisidir. İkinci olarak retroviral ve hücresel

genomlar arası rekombinasyon ile viral genom içine hücrel genleri sokabilir ve yeni oluşturulan genler de onkojenik olabilir (Akkiprik, 2005).

DNA virüsleri ise konak hücrenin DNA replikasyon sistemini kendi hayatta kalma stratejileri ile kullanır, ayrıca bu sistemde anahtar rol onayan tümör baskılayıcı genleri bloke ederler (Akkiprik, 2005).

Kanser sıklığı ile ilgili araştırmaların çoğu, kanser gelişimine katkısı olan faktörler olarak fiziksel çevre ve kişisel alışkanlıkların rolünü açıkça belirtmektedir. Kanser oluşumunda çevrenin rolü hakkında hesaplamalar yapılırken farklı ortamlarda özgül bir genotipin farklı ifade edilebileceği genellikle ihmal edilmektedir, fakat tüm kanserlerin en az %50'sinin çevresel etmenlerle uyarıldığı tahmin edilmektedir. Kanserden sorumlu olan çevresel faktörler; radyasyona maruz kalma düzeyi, meslekle ilgili olarak fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalma ile diyet ve tütün kullanımı gibi kişisel alışkanlıkları ve özellikleri içine almaktadır (Klug ve Cummings, 2002).

## **2.2 Kolorektal Kanser**

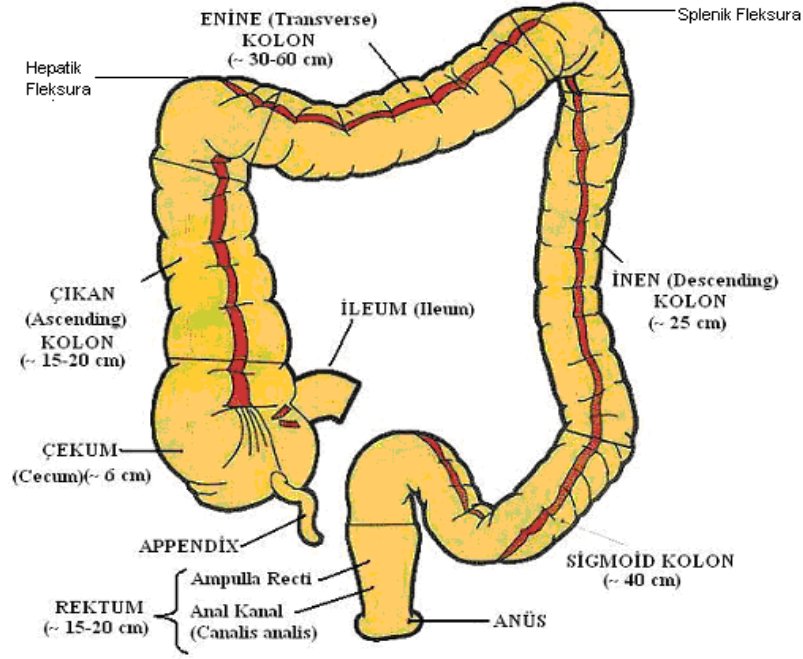
### **2.2.1 Kolorektum Anatomisi**

Abdominal bir organ olan kolon ve rektum sindirim sistemine ait organlardır, karın boşluğu ile pelviste ince barsak ve anüs arasında yer almaktadırlar. En distal ucu olan rektum hariç periton ile çevrilidir. Kolonun uzunluğu erişkinlerde değişken olup ortalama olarak 100–150 cm civarında ve ince barsağın 1/4 uzunluğundadır. Çapı çekumda 7,5 cm olup derece derece azalarak sigmoid kolonda 2,5 cm'e kadar iner. Sırasıyla çekum, çıkan (sağ) kolon, transvers kolon, inen (sol) kolon, sigmoid kolonla devam ederek rektosigmoid köşede rektumla birleşerek kalın barsağı meydana getirir (Şekil 2.1). Embriyolojik olarak çekum, çıkan kolon ve transvers kolonun sağ yarısı orta barsaktan (midgut), transvers kolonun sol yarısı, inen kolon, sigmoid kolon, rektum ve anüs ise alt barsaktan (hindgut) köken alır. Kolon, ince barsak ve kalın barsak arasındaki bağlantıyı oluşturan ileoçekal sfinkter ile başlar. Kolonun ilk parçası çekumdur, boy ve genişliği 6–8 cm olan keseleşmiş bir organdır. Appendiks, çekumun posteromedial yüzünde ileoçekal kavşağın 3 cm altında doğal bir kör uzantıdır, ortalama uzunluğu 8–10 cm olup çapı ise yaklaşık 5 mm'dir. Çıkan kolon (ascending); yaklaşık 15 cm uzunluğunda olup, kolonun çekumdan karaciğerin

sağ lobuna, karnın sağ tarafında retroperitoneal olarak uzanan kısımdır. Enine kolon (transverse) kalın barsağın en uzun parçasıdır (45 cm) ve abdomeni çaprazlayarak geçer. Bunu takip eden kısım inen kolonu (descending) oluşturur, splenik döneçten pelvis sınırına doğru uzanır ve yaklaşık 25 cm uzunluğundadır. Yaklaşık 40 cm uzunluğunda “S” şeklinde yerleşen sigmoid kolon inen kolon ile rektumu birbirine bağlar. Sigmoid kolon, uzun mezenteri nedeniyle kolonun en serbest ve hareketli bölümünü oluşturur. Rektum proksimal ve distal sınırları tartışılabilir olmakla beraber yaklaşık 12–15 cm uzunluğundadır. Gastrointestinal sistemin son parçası olan rektum anüsle son bulur. Kolon ve rektum birbirlerine çok yakın olmalarından dolayı bu iki organın kanserleri kolorektal kanser terimi altında birlikte tartışılır (Akpınar, 2006; Bugra, 2003; Demirel 2005; Ay, 2005).

Kolonun arteryal dolaşımı üç ana arter tarafından sağlanmaktadır. Çekumdan splenik fleksuraya kadar olan bölüm; süperior mezenterik arter, inen kolon, sigmoid kolon ve üst rektum; inferior mezenterik arter, alt rektum ise internal iliak arterden dallanan interior rektal arter tarafından kanlanmaktadır (Ay, 2005).

Kalın barsağın fizyolojik görevleri ise mikroflora metabolizması ile alınan gıdaların yıkılması, su ve elektrolitlerin emilmesi, semisolid maddelerin depolanması, mikrofloral metabolizma ile alınan materyallerin yıkılması ve feçesin rektum ve anüse doğru ilerletilmesidir (Akpınar, 2006; Menteş, 2003).



**Şekil 2.1** Kalın barsağın başlıca bölümleri (Akpınar, 2006; Ay, 2005)

### 2.2.2 Kolorektum Histolojisi

İki tabaka halinde bulunan kolorektal mukoza, longitudinal ve sirküler düz kas hücreleri ile çevrilidir. Normal kolorektal mukoza 3 tabaka halinde bulunmaktadır. Bunlar epitelyum (yüzeysel ve kriptik), lamina propria ve muskularis mukoza tabakalarıdır. Yüzeysel epitel tabakası, tek sıralı silindirik hücrelerden oluşmaktadır. Bu tabakada absorptif hücreler (iyon ve su absorpsiyonundan sorumlu) ve goblet hücreleri (müsin sentezi, salınımı ve depolanmasından sorumlu) bulunmaktadır. Bu epitel tabakanın altında kollojen ve diğer proteinlerden oluşan ince bir membran bulunmaktadır. Özellikle proksimal kolonda silindirik epitel hücreleri kolorektal kriptleri oluşturmaktadır. Kolorektal kriptlerin yapısında absorptif ve goblet hücrelerinin yanı sıra farklılaşmamış öncü hücreler, endokrin hücreler (salgı granülleri içeren) ve nadir olarak Paneth hücreleri de bulunmaktadır (Ay, 2005; Ponz de Leon ve Gregorio, 2001).

Lamina propria, kriptler ve muskularis mukoza tabakaları arasında yer alan ve çeşitli hücrelerden oluşan bir tabakadır. Bu hücreler arasında fibroblast, lenfosit, plazma hücreleri, eozinofil, makrofaj ve mast hücreleri bulunmaktadır (Ponz de Leon ve Gregorio, 2001; Ay, 2005).



Muskularis mukoza düz kas hücrelerinden oluşan ince bir tabakadır. Muskularisin kasılması mukozanın şeklini değiştirebilir ve böylece normal fizyolojik olaylar etkilenebilir (su ve elektrolitlerin absorpsiyonu, musin sentezi, hücre replikasyonu) (Ponz de Leon ve Gregorio, 2001).

İnsan kolon epiteli, aktif olarak çoğalabilen ve kendi kendini yenileyebilen hücrelerden oluşmaktadır. Replikatif hücreler kolonik kriptlerin alt ¼'lük bölümüne yerleşiktirler. Bu hücreler, yüzeyel hücrelerin bulunduğu üst mukozaya doğru 4-6 gün süren bir zamanda hareket ederek ulaşmaktadırlar. Kolorektal karsinogenezin erken evrelerinde, kriptlerin alt bölümünde bulunan hücrelerin, üst bölüme hareketi sırasında, DNA replikasyonunu baskılayamadıkları gösterilmiştir. Bunun sonucu olarak kriptlerde hızla çoğalan hücre toplulukları oluşmaktadır. Bu durum klinik olarak kolorektal malignensilerin oluşumu için yüksek risk oluşturmaktadır (Ay, 2005; Ponz de Leon ve Gregorio, 2001).

### **2.2.3 Kolorektal Kanseri Epidemiyolojisi**

Kolorektal kanserler gelişmiş ülkelerde kanser ölümlerinin en yaygın sebepleri arasındadır, kanser ölümlerinde kadınlarda akciğer ve meme, erkeklerde ise akciğer ve prostat kanserlerinden sonra üçüncü sıradadır (İzbul ve Müderriszade, 2003). Ankara Ticaret Odası (ATO), Türk Kanseri Araştırma ve Savaş Kurumu ve Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nün birlikte hazırladığı "Kanseri Yükü 2006" raporuna göre, her yıl dünyada 11 milyon, Türkiye'de ise 150 bin kişi kansere yakalanmaktadır. Uluslararası Kanseri Araştırma Merkezi'nin Türkiye ile ilgili 2002 yılı verilerine göre, kolorektal kanser erkeklerde % 6,7 ile 4.sırada, kadınlarda ise % 9,3 ile 2. sırada yer almaktadır (<http://www.atonet.org.tr/yeni/index.php?p=804&l=1>).

Kolorektal karsinomlara 40 yaşın altında çok ender olarak rastlanmaktadır. Genel popülasyonun yaklaşık % 90'ında risk 50'li yaşlardadır ve her 10 yaş artımıyla birlikte risk yaklaşık olarak ikiye katlanmaktadır. Ancak kolorektal kanser genç yaşlarda da oluşabilir (Robins ve Kumar, 1987; Rupnarain vd., 2004; Ay, 2005; Durhan 2006). Rektal karsinomların görülme sıklığı, erkeklerde kadınlara oranla daha fazladır. Kolon kanserlerinde ise her iki cinsiyette görülme sıklığı eşit oranlardadır (Ay, 2005).

Farklı coğrafik bölgelerde kolorektal kanserin görülme sıklığı 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 vd., 2002, Rupnarain vd., 2004; Durhan, 2006). Göçmen popülasyonlarındaki çalışmalarda, risk grubu düşük olan ülkelere yüksek olan ülkelere yapılan göçlerde, çevresel etkilerin kolorektal kanser duyarlılığını etkilediği ve yapılan göçlere paralel olarak kanser riskinin arttığı tespit edilmiştir (Smith vd., 2002; Durhan, 2006).

#### **2.2.4 Kolorektal Kanser Gelişiminde Etkili Olan Risk Faktörleri**

Kolorektal kanserlerin büyük bir çoğunluğu sporadiktir, bununla beraber genetik ve çevresel faktörler de bu kanserin oluşumunda önemlidir (Weitz vd., 2005). Kolorektal kanser gelişimini etkileyen muhtemel nedenler diyet ve diğer çevresel faktörler, yaş, adenom ve karsinom öyküsünün olması, diğer predispozan hastalıklar (özellikle inflamatuvar bağırsak hastalığı) ve aile öyküsüdür (Erarslan ve Türkay, 2007). Kolorektal kanser gelişiminde etkili olan risk faktörleri Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

**Tablo 2.1** Kolorektal kanser gelişiminde etkili olan risk faktörleri (Weitz vd., 2005)

<p><b><u>Sporadik Kolorektal Kanser (% 88-94)</u></b></p> <p>İleri yaş Cinsiyet Kolesistektomi Üreterokolik anastomoz Hormonal faktörler (Hiç çocuk sahibi olmamak, ileri yaş gebelik, erken menapoz)</p> <p><b><i>Çevresel Faktörler</i></b></p> <p>Et ve yağ bakımından zengin, lif, folat ve kalsiyum bakımından fakir beslenme Hareketsiz yaşam Şişmanlık Diabetes mellitus Sigara kullanımı Aşırı alkol alımı Radyasyon Mesleki tehlikeler (asbest)</p> <p><b><i>Hasta Öyküsü</i></b></p> <p>Kolorektal polip öyküsü Kolorektal kanser öyküsü İnce bağırsak, yumurtalık, endometrium ve meme kanser öyküsü</p>
<p><b><u>Ailesel Kolorektal Kanser (% 20)</u></b></p> <p>Birinci ve ikinci dereceden akrabalarından;</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• 1 kişide kolorektal kanser varsa, risk 2-3 kat</li><li>• 2 veya daha fazla kişide kolorektal kanser varsa, risk 4-25 kat</li><li>• Kolorektal kanserli kişiler 45 yaşın altında ise, risk 3-9 kat</li><li>• Ailesel kolorektal adenom öyküsünde, risk 2 kat daha fazladır.</li></ul>
<p><b><u>İnflamatuar Bağırsak Hastalıklarından Gelişen Kolorektal Kanserler (% 1-2)</u></b></p> <p>Ülseratif kolit Crohn's kolit</p>
<p><b><u>Kalıtsal Kolorektal Kanserler (% 5-10)</u></b></p> <p>Polipozis Sendromları</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP)</i></li><li>• <i>Gardner's Sendromu</i></li><li>• <i>Turcot's Sendromu</i></li><li>• <i>Atenüe Adenomatöz Polipozis Koli</i></li><li>• <i>Flat Adenom Sendromu</i></li></ul> <p>Kalıtsal Non-Polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC)</p> <p>Hamartomatöz Polipozis Sendromları</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Peutz-Jeghers Sendromu</i></li><li>• <i>Jüvenil Polipozis Sendromu</i></li><li>• <i>Cowden Sendromu</i></li></ul>

Kolorektal kansere neden olan faktörler arasında en çok dikkat çekenlerden biri beslenme alışkanlıklarıdır. Diyetle ilgili faktörler: (1) emilemeyen bitkisel liflerden fakir içerik, (2) buna karşılık, zengin bir işlenmiş karbonhidrat içeriği, (3) yüksek yağ miktarı (ette olduğu gibi), (4) A, C ve E vitaminleri gibi koruyucu mikro besinlerin az tüketimi. Düşük lif içeriğinin, dışkı hacminin az olmasına, dışkının bağırsakta kalma süresinin uzamasına ve bağırsaktaki bakteriyel floranın değişim geçirmesine yol açtığı öne sürülmektedir. Bakteriler tarafından parçalanan karbonhidratların, potansiyel olarak toksik olan oksidatif yan ürünleri, dışkı içerisinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve kolonik mukoza daha uzun süreyle bunlara maruz kalır. Dahası yüksek yağ tüketimi karaciğer tarafından kolesterol ve safra asitleri üretimini artırır. Bunlar, intestinal bakteriler tarafından potansiyel karsinojen maddelere dönüştürülebilirler. Rafine diyetler A, C ve E vitaminlerinden fakirdir. Bu vitaminlerin oksijen radikallerini yok edici etkileri vardır (Kumar vd., 2000).

#### **2.2.5 Kolorektal Kanserlerin Yayılımı:**

Kolorektal kanserler genellikle adenomatöz polip veya glandlarda intramukozal epitelyal lezyonlar olarak başlarlar. Kanseri odağı başlangıçta sadece mukozadadır (karsinoma in situ). Lezyonun gelişmesiyle muskularis mukoza ve submukozaya ulaşarak invaziv kanser haline gelirler. Bu aşamadan itibaren lokal yayılım yanında, lenfatik ve hematojen yayılım ortaya çıkabilir (Çakar, 2007).

**Lokal Yayılım:** Tümörler lümene doğru veya barsak katlarının içine doğru yayılırlar. Kolon kanserlerinde barsak uzun eksenine doğru yayılımın kısıtlı olduğu, daha çok sirküler yayılım şeklinde olduğu bildirilmiştir. Submukozayı aşan tümör, seroza ve komşu organları tutabilir. Komşu organ tutulumu seroza bulunmadığı için rektum kanserlerinde daha çabuk görülmektedir. Lokal yayılım, perinöral invazyon veya perinöral saha tutumu şeklinde primer tümör odağının 10 cm uzağına kadar ulaşabilmektedir (Çakar, 2007).

**Lenfatik Yayılım:** Normal lenfatik akım ana arterlere paralel olan lenf kanallarıyla olur ve kolon kanseri perikolik, ara ve ana lenf düğümleri boyunca yayılım gösterirler. Lenfatik yayılım düşük dereceli tümörlerde % 30, yüksek dereceli tümörlerde % 81 oranında görülmektedir (Çakar, 2007).

**Hematojen Yayılım:** En sık yayılım bölgesi portal ven yoluyla karaciğerdir. Karaciğerden sonra akciğerlere de yayılım olabilmektedir. Karaciğer ve akciğer metastazı olmadan diğer organlara hematojen yayılım çok nadirdir. Rektal kanserlerde; 1/3 alt rektum kanserleri süperior hemoroidal ven ile karaciğere hematojen metastaz yaparlarken, orta hemoroidal ven ve inferior vena kava yoluyla akciğerlere erken hematojen yayılım gösterebilirler. 2/3 üst kısım kanserleri ise sadece karaciğere metastaz yaparlar. Portal sistem ile vertebral venler arasındaki anastomozlar nedeniyle ara sıra lomber ve torasik vertebra metastazları görülebilir (Çakar, 2007).

**İmplantasyon ile Yayılım:** Primer tümör hücrelerinin diğer bir yüzeyde lezyon meydana getirmeleridir. İntralüminal yayılım ile tümör hücrelerinin daha distalde bulunan bir fistül, ülser, hemoroid veya apse üzerine implante olabileceği bildirilmiştir. Serozal yüzeyden periton yayılımı olabilir ve peritoneal karsinomatoz gelişebilir. Cerrahi manipulasyonlar nedeniyle dikiş hattında %10 oranında rekürrens tarif edilmiştir (Çakar, 2007).

Kolorektal tümör hücreleri, hem yatay hem de derine doğru ilerleyerek organ ve dokulara infiltre olabilmektedirler. Mesane, prostat, vajina, uterus, üreter, perinöral kaslar ve pelvik kemiği bu hücrelerin yayılım gösterdiği organ ve dokular arasında ilk sıralarda yer almaktadırlar (Ay, 2005).

### **2.2.6 Kolorektal Kanser Evrelendirilmesi**

Diğer kanser tiplerinde olduğu gibi, kolorektal kanserlerde de, cerrahi girişim sonrası, klinik ve patolojik evrelendirme, klinik gidişin ve prognozun belirlenmesindeki en önemli aşamadır. Kolorektal karsinomlar başlangıçta iyi diferansiye, orta diferansiye ve kötü diferansiye olarak evrelendirilmekteydi. Bu evrelendirme, akademik bir sınıflandırmadan ibaret olup, sağ kalım oranı, prognoz ve tedaviyi yönlendirici kriterlere göre düzenlenmediğinden, klinik yaklaşımlar için yeterli değildir. Son yıllarda ise kolorektal kanserlerin evrelendirilmesinde yeni kriterler dikkate alınmaktadır. Bunlar;

- Tümör büyüklüğü,
- Yerleşimi,
- Tümöral hücrelerin nükleer polaritesi,

- Basit, kompleks yada düzensiz tubül yapısı,
- İnvazyon derinliği,
- Lenf düğümü ve uzak organ metastazı,
- Tümör yayılım şekli,
- Peritona yayılım,
- Lenfositik infiltrasyon ve
- Fibrozis miktarıdır (Ay, 2005).

Kolorektal kanserlerin evrelendirmesinde kullanılan Dukes evrelendirmesi ise yaklaşık 70 yıl önce tanımlanmış olup, halen kullanılmaktadır. 1986 yılında ise Hutter ve Sobin “Universal Staging System for Cancer of the Colon and Rectum” adlı evrelendirme sistemini ileri sürmüşlerdir. Bu sisteme göre Dukes evreleri, klinik ve patolojide yaygın olarak kullanılan “Tümör, Node, Metastaz (TNM)” sistemine adapte olarak güncellenmiştir (Ay, 2005).

#### **2.2.6.1 TNM Derecelendirme Sistemi**

TNM derecelendirme sistemi, kanserin ne kadar uzağa yayılabildiğinin tanımlanması için standardize edilmiş bir yoldur. Tüm kanser çeşitleri için derecelendirme sisteminin ayrıntıları arasında bir takım küçük farklılıklar vardır fakat temel yaklaşım aynıdır. Bazıları hariç tutulursa (lösemi ve beyin tümörleri gibi) kanserin her tipi için derecelendirme sistemi kurulmuştur:

**T kategorisi:** Kanser, organda ne kadar bir alana yayılmaya başladığı ve diğer yakın organ ve dokulara ilerleyip ilerlemediği hakkında bilgi vermektedir.

**N kategorisi:** Kanser lenf bezleri yakınlarına yayılıp yayılmadığı konusunda bilgi vermektedir.

**M kategorisi:** Kanser, vücudun uzak alanlarına metastaz yapıp yapmadığını göstermektedir.

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

**Tx:** Tümörün boyutu belirlenememiştir.

**Tis:** Kanserin en erken derecesidir. Tümör kolon veya rektum mukozasının (iç tabaka) dışında büyümmez. Bu aşama ayrıca karsinoma in situ ya da intramukozal karsinoma olarak da bilinmektedir.

**T1:** Kanser mukozaya doğru ilerler ve submukoza içine yayılır.

**T2:** Kanser submukozaya doğru ilerler ve muskularis propria içine yayılır.

**T3:** Kanser subseroza içine muskularis propria boyunca tamamen ilerler, fakat yakındaki doku ve organlara ilerlememiştir.

**T4:** Kanser rektum veya kolon duvarı boyunca yakın doku ve organlara tamamen yayılmıştır.

N kategorisi, kanserin lenf bezleri yakınlarına yayılıp yayılmadığını ve eğer yayılmışsa lenf bezlerinin ne kadarına yayıldığını işaret etmektedir:

**Nx:** Kanser hücrelerinin lenf bezlerine yayılımı belirlenememiştir.

**N0:** Lenf bezlerinde bulunmamıştır.

**N1:** Kanser hücreleri 1-3 bölgesel lenf bezinde bulunmuştur.

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

M kategorisi kanserin uzak organlara yayılıp yayılmadığı (metastaz) belirtir (örneğin karaciğer, akciğer veya lenf bezleri uzağına):

**Mx:** Metastaz yaptığı belirlenememiştir.

**M0:** Kanser uzak alanlara yayılım göstermemiştir.

**M1:** Kanser uzak alanlara yayılım gösterir (American Cancer Society, 2004).

### **2.2.6.2 Evre Gruplaması**

Bir hastanın T, N, M kategorileri, genellikle cerrahiden sonra belirlenmektedir, bu bilgi evre gruplaması olarak adlandırılan ve roman rakamıyla evre 0'dan evre IV'e kadar kategorilendirilen bir sistem ile birlikte kombine edilmektedir. Bu evreler aşağıda verilen aşamalarla ifade edilmektedir.

**Evre 0 (Tis, N0, M0):** Kanserde en erken evredir. Kolon ve rektumun iç tabakası (mukoza) dışında ilerlemez. Bu evre, 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. Fakat lenf bezlerine veya uzak alanlara yayılmaz.

**Evre IIB (T4, N0, M0):** Kanser kolon veya rektum duvarına ve yakınlardaki doku veya organlara 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 1–3 lenf bezine 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 1–3 lenf bezine yayılır fakat uzak alanlara yayılmaz.

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

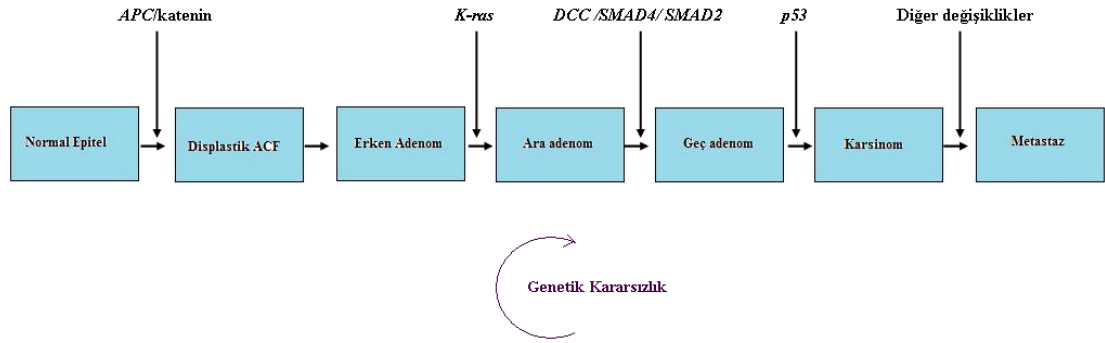
**Evre IV (M1):** Kanser N ve T kategorilerinde olmayabilir fakat uzak alanlara yayılır (örneğin karaciğer, akciğer, periton gibi) (American Cancer Society, 2004).

### **2.2.7 Kolorektal Kanserlerde Gözlenen Önemli Genetik Değişiklikler**

Kolorektal kansinomlar, moleküler genetiği tüm insan kanserleri arasında en iyi anlaşılmiş olanıdır. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi kolorektel kanserlerde de tümör oluşumundan onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve stabilize genlerdeki değişiklikler sorumludur. Kolonik epitelyumdaki karsinogenez çok basamaklı bir süreçtir. 1990 yılında Vogelstein ve Fearon tarafından kolorektal kanserin moleküler temeli ortaya konulmuştur. Adenom-karsinom dönüşümü olarak da bilinen Vogelstein modeline göre malignant dönüşüm için germline ya da somatik



mutasyonlara ihtiyaç vardır ve tümör, genetik değişimlerin çok basamaklı birikimiyle ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.2). Sporadik kanserler çok sayıda somatik mutasyonların birikimi ile oluşurken, kalıtsal sendromların temelini (HNPCC gibi) germline mutasyonlar oluşturmaktadır (Souglakos, 2007).



Şekil 2.2 Kolorektal kanser oluşumunda genetik bir model (Scriver vd., 2001)

Kolorektal kanserler genellikle adenomatöz polipozis koli (*APC*) genindeki mutasyon sonucu oluşmuş olan adenomlardan ortaya çıkarlar ve bu durum kromozomal kararsızlık olarak tanımlanır. Bununla beraber kolorektal kanserlerin yaklaşık %10-15'i mikrosatellit kararsızlık (MSI, DNA replikasyon hatası) sonucu ortaya çıkmaktadır (Souglakos, 2007).

Kromozomal kararsızlığa sahip tümörler hiperploidi, allelik kayıplar (17p, 18q, 8p, 22q), ve çoğunlukla tümör baskılayıcı gen mutasyonları (*p53* ve *APC*) ile ilişkilidir. Bu tip tümörler özellikle sol kolona lokalize olmuşlardır (Souglakos, 2007).

*APC* genindeki mutasyonlar hem sporadik hem de kalıtsal tümörlerin ortak özelliğidir ve tümör oluşum sürecinin ilk evrelerinde meydana gelir. *APC* genindeki mutasyonları, *K-ras* ve *p53* genlerindeki mutasyonlar izler ve bu mutasyonlar da ileri evrelerde gözlenmektedir. Bir tümör baskılayıcı gen olan *APC* geni, kolorektal kanserin ilk gelişim aşamalarında kritik bir öneme sahiptir (Souglakos, 2007). Nishisho vd. (1991) tarafından ailesel adenomatözis koli ve kolorektal kanserli hastalarda 5q21 kromozom bölgesinde lokalize olan *APC* geninde mutasyonlar saptanmıştır. *APC* proteini, normal hücrelerde  $\beta$ -kateninin azalmasına sebep olan hücre içi bir protein kompleksinin parçasıdır.  $\beta$ -katenin, farklılaşmış hücrelerde hücre iskeletinin aktin flamanlarına E-kadherin epitelyal adezyon molekülünü bağlar.

Azalma hücre içi  $\beta$ -katenin miktarını düzenler ve sabit halde tutar. İnsan neoplazilerinde *APC* fonksiyon mutasyonlarının kaybı ile bir patolojik inhibisyon ortaya çıkar. Sporadik kolorektal tümörlerin %50'sinde *APC* geninde çerçeve kayması mutasyonları görülmektedir. Ailesel adenomatozis polipozis olgularında ise germline *APC* gen mutasyonları saptanmıştır (Ay, 2005; Thomas, 2005; Souglakos, 2007).

*Ras* geni bir onkogen olup, üç hücreşel şekli bulunmaktadır. Bunlar; *H-ras*, *K-ras* ve *N-ras*'dir. Bunlardan insan kolorektal kanserlerinde en sık mutasyona uğrayanı *K-ras*'dir. Bu onkogen 12p12.1 bölgesine yerleşiktir ve 21kD'luk, 189 amino asitten oluşan GTP'ye bağlanan bir proteini kodlamaktadır. *K-ras* gen ürünü proliferatif ve mitojenik uyarıda, hücre büyümesi sinyal ileti yollarında önemli işlevler üstlenmiştir. *Ras* mutasyonları sporadik kolorektal kanserlerin %50'sinden fazlasında ve 1cm'den büyük olan kolonik adenomların %50'sinde görülmektedir. Daha küçük adenomlarda ise nadiren görülmektedir. Adenomlar küçükken mutasyonlar görülmesine dahi adenom oluşumunun ileri evrelerinde *Ras* mutasyonları meydana gelmektedir (Ay, 2005; Souglakos, 2007).

17. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan *p53* geni insan kanserlerinde mutasyona uğramış ortak bir genidir. Kolorektal kanserlerin %75'den fazlasında 17p lokusunda heterozigotluk kaybı (LOH) tespit edilmiştir. Bununla beraber adenomlarda bu kromozom bölgesindeki kayıplar nadir olmaktadır. *p53* gen kayıpları kolorektal tümörögenезin ileri evreleri ile ilişki göstermektedir (Souglakos, 2007).

*APC* ve *p53* genlerinde olduğu gibi, 18q kromozom bölgesindeki bir tümör baskılayıcı genin varlığı ilk kez kolorektal kanserlerdeki allelik kayıp çalışmalarından elde edilmiştir. Bu konuda yapılan bir çalışmada sporadik kolorektal kanserin %73'ünde ve invaziv kanser odaklı büyük adenomların % 47'sinde 18q'nun bir kopyasında kayıp tespit edilmiştir (Souglakos, 2007).

Kolorektal kanserlerde, 18q21 kromozom bölgesi üzerinde lokalize, tümör baskılayıcı gen olan *DCC* geninde nokta mutasyonlar bulunduğu bildirilmiştir (Keino-Masu vd., 1996). 18q üzerindeki ikinci bir tümör baskılayıcı gen ise *SMAD* genidir. *SMAD4* transforme edici büyüme faktör- $\beta$  (*TGF- $\beta$* ) süper ailesinin sinyal yolağında önemli rol alan bir proteini kodlar. *TGF- $\beta$*  çoğu normal hücrelerde

büyüme baskılar fakat birçok kanser hücresi bu büyüme baskılayıcı etkiye dirençlidir (Reiss vd., 1997). *SMAD4* genindeki ya da 18q üzerinde yerleşik olan üçüncü bir aday tümör baskılayıcı gendeki (*SMAD2*) mutasyonlar sporadik kolorektal kanserin bir alt grubunda bulunmuştur (Eppert vd., 1996). *SMAD4* genindeki germline mutasyonların ailesel juvenil polipozise (FJP) neden olan mutasyonlar olduğu yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir (Fogt vd., 2004). Bir fosfatazı kodlayan *PTEN* geni ile serin-treonin kinaz reseptörünü kodlayan *BMPRIA* geni de bazı ailelerde FJP ile bağlantılıdır (Souglakos, 2007).

Kolorektal kanserle ilişkisi olan bir diğer gen de *Src* onkogenidir. Bu gen ilk olarak Rous Sarcoma virüsünde tanımlanmıştır. Kodladığı transforme protein direkt olarak hücre iskeletini modifiye etmektedir. Hücre iskeletinin bozulması malignan dönüşüm ve karsinogenezdeki basamakların erken safhalarında oluşabilir. Sporadik kolon kanseri ile ilişkisi olduğu düşünülen diğer iki onkogen ise; *c-myc* ve *c-erbB2* onkogenleridir (Calvert ve Frucht, 2002).

Baz kesme tamir geni olarak bilinen *MYH* genindeki germline mutasyonlar kolorektal kanserli aile öyküsü olan ve çeşitli kolorektal adenoma sahip olan hastaların küçük bir kısmında tanımlanmıştır (Souglakos, 2007). *MYH* SNP'lerinin bir kısmı, bu protein-protein etkileşimlerini potansiyel olarak engelleyebilir, böylelikle DNA onarımında hatalara sebep olarak sonuçta kolorektal karsinogenezi tetikleyebilir. *MYH* geninin kromozomal lokalizasyonu 1p32-34'dür. Kolorektal karsinom oluşumunun erken evrelerinde gözlenen hiperplastik poliplerde ve adenomalarda bu kromozom bölgesinde heterozigotluk kayıpları olduğu tespit edilmiştir (Sieber vd., 2003; Kambara vd., 2004; Akpınar, 2006).

Kolorektal kanserin kalıtsal formlarından biri olan HNPCC, mikrosatellit kararsızlık ile karakterizedir. Bu tümörler mutasyona çok açıktır, çünkü DNA "yanlış eşleşme tamir mekanizması (mismatch repair (MMR))" sistemi defektiftir. Bu sistemin genleri (*hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hPMS1*, *hPMS2* ve *hMSH6*) HNPCC hastalarında germline mutasyonları taşımaktadır. MMR sistemi, hatalı baz eşleşmesini ve DNA replikasyonu sırasında büyük bir olasılıkla doğru bir şekilde kopya edilemeyen DNA'nın küçük tekrar dizilerini (mikrosatellit) direk olarak tanır ve tamir eder. Hatalı baz eşleşmesi eğer tamir mekanizması tarafından tanınmaz ise nükleotid transisyon ve transversiyonlarına neden olur ve genetik dizide değişiklikler meydana

gelir. Mikrosatellit kararsızlık HNPCC vakalarının % 80'inden fazlasında görülürken sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %15-20'sinde tanımlanmıştır ve MMR genlerinin mutasyonları ile ilişkilidir (Akkiprik, 2005; Akpınar, 2006).

Kanser gelişiminde epigenetik faktörler de önemli bir yer tutmaktadır. Bu epigenetik faktörlerden DNA metilasyon kalıbındaki değişimler kolorektal kanserlerde rolü olan faktörlerdendir. Kolorektal kanserlerde gözlenen DNA metilasyon değişimleri şunlardır;

1. 5-Metil sitozinlerin azalması ile genomik hipometilasyon ve belirli genlerin progressif hipometilasyonu,
2. Artmış DNA metil transferaz ekspresyonu ve aktivitesi sonucu DNA metilasyon kapasitesinin artması,
3. Spesifik genlerin CpG adacıklarının bölgesel hipermetilasyonu,
4. 5-Metil sitozin deaminasyonu sonucunda C→T transisyonları ve dolayısıyla mutasyon oranında artış.

Yukarıda verilen bu değişimler kromatin yapısal değişimleri, genetik kararsızlık, onkogenlerin ekspresyonlarının artması, tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel inaktivasyonu ile sonuçlanabilir. Bölgesel hipermetilasyon tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunun bir nedeni olan nokta mutasyonu ve allelik kayıplara alternatif olarak rol oynamaktadır (Akkiprik, 2005).

Kolorektal tümörlerde onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin yapısal değişimleri yanında diğer bazı gen ve gen ürünlerinin aktivite ya da ekspresyonlarında farklılıklar belirlenmiştir. Örneğin birçok kolorektal kanserde *c-myc* yüksek düzeylerde eksprese edilmektedir (Wilson vd., 1997). Spesifik proteinlerin tirozin kinaz aktiviteleri de çoğu kolorektal karsinomlarda yüksektir (Wilson vd., 1997). *c-myc* nükleer bir fosfoproteini kodlamaktadır. Hücre proliferasyonu sırasında indüklenir ve muhtemelen DNA sentezi için gereklidir. Artmış *c-myc* düzeyi kolorektal adenomlar ve karsinomların % 60-70'inde tespit edilmiştir. Bu proteinler normal hücrelerde sinyal iletimi, farklılaşma ve proliferasyon ile ilişkilidir (Akkiprik, 2005).

Kolorektal kanser gelişiminde telomeraz aktivitesinde rolü olduğu yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur (Wilson vd., 1997). İlerleyen telomer

kısalması, kontrolsüz hücre proliferasyonunun önlenmesinde önemli bir mekanizmadır. Bu, telomeraz enzimi ile önlenebilir. Telomeraz enzimi normal somatik hücrelerde eksprese edilmemektedir. Çoğu adenomda telomeraz aktivitesi yokken kolorektal karsinomu da içeren kanserlerin büyük çoğunluğunda telomeraz aktivitesi artmıştır (Akkiprik, 2005; Kumar vd., 2005).

## **2.2.8 Kolorektal Kanserlerin Sınıflandırılması**

Kolorektal kanserler, sporadik (kişide ortaya çıkan) (%75), ailesel (%20) ve Ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP) ve Kalıtsal Polipsiz Kolorektal Kanser (HNPCC-Lynch sendromu) gibi genetik (%5) olarak sınıflandırılırlar (Hendon ve Dipalma, 2005).

### **2.2.8.1 Ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP)**

FAP, kalıtsal kolorektal kanserler için klasik bir örnektir ve yaklaşık 100 yıldır bilinen bir hastalıktır (Durhan, 2006). FAP, 13 ile 19'lu yaşlar arasında multipl kolonik adenomların gelişmesi ve ileri yaşlarda poliplerin sayısının fazlalaşması ile karakterize olmaktadır. Kolonik adenomlar, poliplerin ortaya çıkmasından yaklaşık 10–15 yıl sonra ve genellikle 40'lı yaşlarda gözlenmektedir. FAP ile ilişkili adenomlar ve adenokarsinomlar kolonun tamamına yayılmıştır ve histolojik olarak sporadik kolorektal kanserde görülenlerle aynıdır. Neredeyse bütün FAP'lı hastalarda duodenal, periampüler ya da ampüler adenomlar gelişmektedir. FAP'lı hastaların yaklaşık % 10'unda ise 60 yaşından sonra duodenal adenokarsinomlar gelişmektedir (Souglakos, 2007). Tüm kolorektal karsinomların %0,5'ini FAP oluşturmaktadır (Göral, 2003).

FAP otozomal dominant geçiş gösteren bir hastalıktır ve *APC* geninin germline mutasyonu sonucu oluşmaktadır. 1987 yılında gen haritalama çalışmaları ve RFLP (restriction fragment length polymorphism) analizi ile FAP geni 5q21-q22 kromozom bölgesine lokalize edilmiştir. 1991 yılında, FAP'dan sorumlu gen, *APC* geni olarak adlandırılmıştır (Göral, 2003). *APC*, wnt sinyal yolu, hücre içi adezyonda, iskelet stabilizasyonunda, hücre siklusu düzenlenmesinde ve apoptozisde rolü olan önemli bir tümör baskılayıcı gendir (Conlin vd., 2005). FAP'a neden olan mutasyonlar, *APC* proteininin uç kısmında delesyona neden olmaktadır. Uç kısmından kesime uğrayan protein, normal *APC* allelinden oluşan normal *APC*

proteinini inaktive etmektedir. FAP hastalarındaki tüm kolon epiteli; kriptalar boyunca artmış proliferasyonla karakterizedir ve *APC* genindeki inaktivasyonun bu proliferasyondan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bu hiperproliferatif epitelyum, takiben oluşan mutasyonlar ya da gen delesyonları ile neoplastik transformasyona uğrar (Göral, 2003).

FAP'ın atenüe (azaltılmış) bir formu olan AFAP (Atenüe Ailesel Adenomatöz Poliposis), klasik formdan farklıdır ve bu formda 100'den daha az sayıda kolonik polipler bulunmaktadır. Bu polipler kolonun sağ tarafında gelişme eğilimi gösterirler. Bu poliplere sahip bireylerde kanser oluşumu yaklaşık olarak 15 yıl gecikmektedir. AFAP'ın özellikleri ile HNPCC'nin özellikleri birbirleri ile örtüşmektedir, fakat bu iki sendrom genetik testler ile ayırt edilmektedir (Souglakos, 2007).

#### **2.2.8.2 Kalıtsal Polipsiz Kolorektal Kanser (HNPCC- Herediter Non-Poliposis Colorectal Cancer-Lynch Sendromu)**

Ailesel kanser olgusu sendromu, Lynch ve arkadaşları tarafından bundan yarım yüzyıl öncesinden bu yana çalışılmakta ve bu konuda veri toplanmaktadır. Bu ailelerde kolorektal kanserler en yaygın kanser olgusudur ve sendromun varlığı FAP sendromunda olduğu gibi multipl adenomatöz oluşumlar benzeri patolojik veya herhangi diğer klinik belirteçler vermemektedir. Bu nedenle sendrom kalıtsal polipsiz kolorektal kanser (HNPCC) olarak tanımlanmıştır. 1984'lere gelindiğinde bu sendrom içerisinde değerlendirilen kanser olguları Lynch sınıflandırması tip I ve tip II olmak üzere iki ayrı grupta sınıflandırılmıştır. Bunlardan ilki, sendromun yalnızca kolon ve rektumla sınırlı olduğu olguları, ikincisi ise ekstra kolonik yerleşimler gösteren malignitenin olduğu durumları tanımlamaktadır (Korkmaz, 1997).

HNPCC çalışmakta olan birçok merkezin ortak çalışmalar yapabilmesi amacı ile oluşturulan grup HNPCC sendromlu olguları bir kriterler dizgesinde tanımlamayı amaçlamış ve 1991'de bir toplantıda Amsterdam kriterleri olarak adlandırılan kararlar benimsenmiştir. Bu kriterlere göre, bir olgunun HNPCC fenotipinde olabileceği ancak aşağıda tanımlanan verilere bağlı olarak değerlendirilebilecektir.

Bunlar;

1. Histolojik olarak ailede en az üç akrabada (bunlardan en az biri diğerleri ile 1. dereceden akraba olmalı) kolorektal kanser olgusu tanımlanmış olması,
2. Kolorektal kanser olgularının en az iki nesilde birden varlığı,
3. Ailede en az bir olguda 50 yaşının altında kolorektal kanser saptanmış olması,
4. FAP olgusunun olmadığına saptanmış olması (Korkmaz, 1997).

Kalıtsal polipsiz kolorektal kanser (HNPCC), otozomal dominant geçiş gösteren bir sendromdur. Kolorektal kanserlerin ve özellikle kadınlarda başta endometriyum olmak üzere ekstraintestinal kanserlerin riskinin artmış olması ile karakterizedir (Tablo 2.2). Adenomlar daha az sayıdadır, fakat oldukça erken bir yaşta belirirler. Kolon kaynaklı maligniteler tipik olarak splenik fleksura proksimalinde ve multipl yerleşimlidirler ve daha önceden var olan adenomların zemininden gelişmezler (Kumar ve ark, 2000). Kalıtsal polipsiz kolorektal kanser (HNPCC), kolon kanser sendromları arasında Avrupa’da %2, ABD’de %1 oranında görülmektedir. HNPCC’nin gelişim yaşı ortalama olarak 45’dir (Souglakos, 2007).

**Tablo 2.2** HNPCC ile ilişkili kanserlerin oluşma riskleri (Souglakos, 2007)

<b>Kanser çeşitleri</b>	<b>HNPCC olan kişilerde (%)</b>	<b>Genel populasyonda (%)</b>
Kolorektal	80-82	5-6
Endometriyal	50-60	2-3
Mide	13	1
Ovaryum	12	1-2
İnce bağırsak	1-4	1-2
Mesane	4	1-3
Beyin	4	0,6
Karaciğer, böbrek, pelvis	3	1
Safra kesesi	2	0,6

DNA tamir mekanizması ile ilişkili dört genden herhangi birinde meydana gelen kalıtsal mutasyonlar, HNPCC'den sorumludur. İnsanlarda yanlış DNA eşleşmelerinin tamir genleri olan *hMSH2* (kromozom 2p22), *hMLH1* (kromozom 3p21), *hPMS1* (kromozom 2q31–33) ve *hPMS2* (kromozom 7p22), DNA replikasyonu sırasındaki genetik “hata düzeltici” mekanizmalar ile ilişkilidir. İnsan genomundaki dinükleotid sıralanmasında 50.000–100.000 kadar dinükleotid tekrarı vardır. Yanlış eşleşme tamiri genlerinde meydana gelen mutasyonlar, bu tekrarlardaki yaygın değişikliklerin varlığı sayesinde saptanabilir. Buna mikrosatellit dengesizliği adı verilir. Bir adet mutant DNA tamir geni taşıyan bir insanda, geri kalan normal genler sayesinde normal bir tamir aktivitesi mevcuttur. Fakat bazı organlardaki (kolon, mide, endometriyum) hücreler, bu geri kalan sağlam genleri inaktive eden ikinci bir somatik mutasyona yatkındır. Mikrosatellit dengesizliği gösteren çoğu HNPCC tümörlerinde olduğu gibi, normalin 1000 katı fazla mutasyon oranı gözlenir. Sporadik kolon kanserlerinin %10-15’inde DNA tamir genlerinde rastlanan benzer mutasyonlar, bu tümörlerde de somatik (edinsel) mutasyonlar olduğunu göstermektedir (Kumar ve ark, 2000).

### 2.2.8.3 Sporadik Kolorektal Kanser

Normal kolon mukozasının adenomatöz polip ve kolorektal kansere dönüşümü uzun zaman almaktadır. Araştırmacılar sporadik gelişen kolorektal kanserlerde iki genetik yol tanımlamışlardır. Adenomatöz poliplerin % 80’i *APC* gen mutasyonu sonucu meydana gelir. *APC* proteininin koruyucu bir fonksiyonu vardır ve bu proteinin fonksiyon kaybı kromozomal kararsızlığa yol açar (Görümlü, 2005). Sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %40-65’inde *Ras* geninde, çoğunlukla da *K-ras*’da, nokta mutasyonları vardır. *Ras* gen mutasyonlarının, kanserlerin % 47’sinde, 1 cm’den büyük adenomların % 58’inde ve 1 cm’den küçük adenomların %10’unda bulunması neoplazi oluşumuna erken evredeki olayların zemin hazırladığı fikrini destekler. Fakat *Ras* aktivasyonu tek başına kanser gelişimi için yeterli değildir (Eraslan ve Türkay, 2007). Normal olarak yabancı tip p53, hücre döngüsünün ilerlemesini sağlar, apoptozisi düzenler, genotoksik strese sorumludur. *SMAD4*, TGF-beta sinyal yolağında kritik role sahip bir genidir. Adenomatöz polip ve kolorektal kanserlerin %70-80’i COX-2’yi yüksek ekspres ederler ve COX-2 doğal olarak apoptozisi inhibe eder ve anjiyogenezi destekler (Görümlü, 2005).



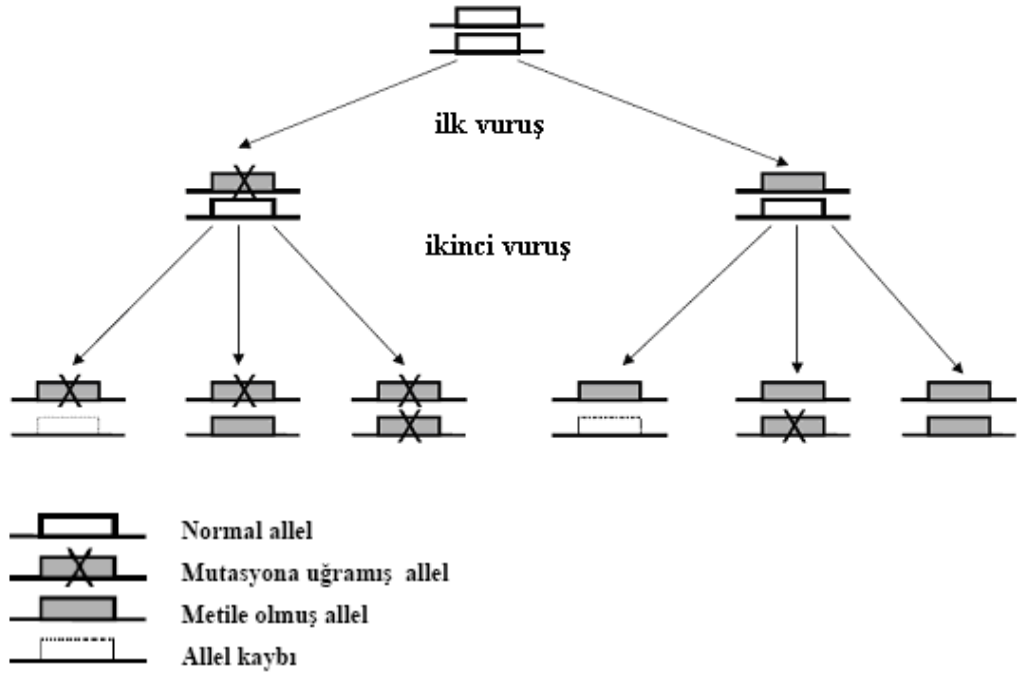
Sporadik kolorektal kanserlerin %15'inin alternatif bir yolak olan mikrosatellit kararsızlık yolağından kaynaklanması olasıdır (Görümlü, 2005).

#### **2.2.8.4 Ailesel Kolorektal Kanser**

Kolorektal kanser vakalarının yaklaşık olarak %20'sinde, bilinen sendromlardan bağımsız olarak genetik yatkınlık mevcuttur. Ailesel kanser sendromlularında olduğu gibi, birinci derece akrabasında kolorektal kanser olanlarda kanser riskinde artış gösterilmiştir. Kanserin başlangıç yaşı ve hasta akraba sayısına bağılı olarak risk 1.8-8 kat artabilmektedir. Yaşa bağılı riske göre, bir tane birinci derece akrabada kanser varlığı riski 1,72 kat, iki veya daha fazla birinci derece akrabada kanser varlığı riski 2,75 kat arttırmaktadır. Etkilenen akrabada kolorektal kanserin başlangıç yaşı 45'in altında ise risk 5,37 kat artmaktadır. 60 yaş üstünde kolorektal kanser gelişmiş olması, riski minimal arttırmaktadır. Birinci derece akrabada kolorektal kanser saptanan kişide, %8 oranında büyük adenom gelişme riski olup, bu kişiler için en uygun tarama yöntemi kolonoskopidir. Ailesel kökenli kolorektal kanser riski, polipin histolojik özelliğı ve büyüklüğünden bağımsızdır (Görümlü, 2005).

#### **2.3 Heterozigotluk Kaybı (LOH)**

Tümör oluşumunda etkili olan tümör baskılayıcı gen ürünleri normalde hücre döngüsünü kontrol ederek veya hasarlı hücreleri apoptozise yönlendirerek hücre proliferasyonunu inhibe etmektedirler. Bu yüzden bu genler tümör ve metastaz gelişimini engellemektedirler (Kopnin, 2000; Yakut, 2007). Karsinogenezdeki Knudson'ın klasik 'iki vuruş' hipotezine göre, tümör baskılayıcı genin her iki kopyasının kaybı neoplastik hücrelerin gelişimi için gerekli normal hücresel fonksiyonların kaybına neden olmaktadır (Şekil 2.3) (Knudson, 1971).



**Şekil 2.3** Tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunda rol oynayan Knudson'ın iki vuruş hipotezi (Yakut, 2007)

Bir canlının somatik hücrelerinin konstitüsyonel genotipi heterozigot iken, çeşitli mekanizmalarla homozigot ya da hemizigot konuma gelmesi 'heterozigosite kaybı' olarak tanımlanır (Tucker, 2002; Yakut, 2007).

Kromozomun belirli bir bölgesindeki allelik kayıp bu bölgede bir tümör baskılayıcı genin varlığını işaret eder. LOH analizi, bu tümör baskılayıcı genlerin lokalizasyonunu belirlemede kullanılan bir metottür. LOH analizi ile birçok kanser türünde spesifik kromozomal bölgelerdeki allelik kayıplara bağlı olarak tümör baskılayıcı genlerin bulunduğu bölgeler belirlenmiştir. Fakat buna rağmen hala kanser gelişiminde önemli roller oynayan keşfedilmemiş birçok tümör baskılayıcı gen bulunmaktadır (Macleod, 2000).

LOH'un belirlenmesi sadece kanser gelişiminin moleküler mekanizmasını anlamayı sağlamaz, bununla beraber hastalığın prognozu ve diagnozu hakkında da bilgi verir (Velasco vd., 2008).

### **2.3.1 Heterozigotluk Kaybının (LOH) Mekanizmaları**

Heterozigotluk kaybı, birkaç farklı mekanizma tarafından meydana gelmektedir. Bu mekanizmalar:

1. Delesyon
2. Gen değişimi
3. Tek ya da çift homolog ve homolog olmayan mitotik rekombinasyon
4. Translokasyon
5. Kromozom kırıkları ve kaybı
6. Kromozomal füzyon (Thiagalingam vd., 2002; Velasco vd., 2008).

Kromozomun tamamının kaybı hücre bölünmesi esnasında kromozomların ayrılmaması sonucunda olmaktadır (Nigro vd., 1989; Schutte vd., 1996). Bir kromozom kolunun ya da büyük bir parçanın kaybı mitotik rekombinasyon, karşılıklı ya da karşılıklı olmayan translokasyonlar sonucunda oluşabilir. Mitotik rekombinasyon, mitotik hücrelerdeki kardeş olmayan kromatidler arasındaki değişim sonucunda oluşmaktadır (de Nooij-van Dalen vd., 1998; Varella-Garcia vd., 1998). Homolog kromozom kollarını içeren mitotik rekombinasyon yada bu kromozom kollarında meydana gelen kırıklar sonucu oluşan delesyonlar bir tek allelin ya da genin kaybına neden olabilmektedir (Hahn vd., 1996; Schutte vd., 1995; Thiagalingam vd., 1996).

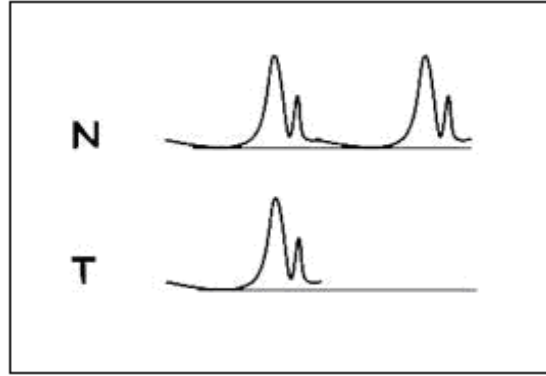
### **2.3.2 LOH Analizinde Kullanılan Metotlar**

#### **2.3.2.1 Mikrosatellit Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

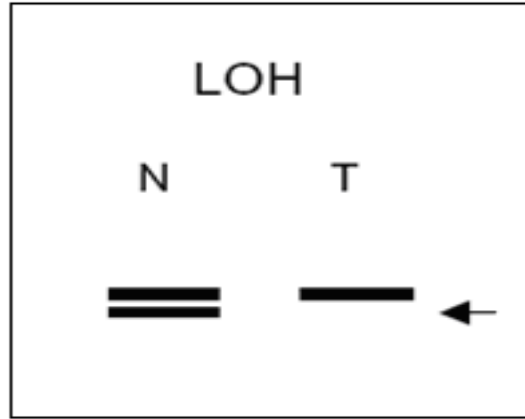
LOH analizi tümör baskılayıcı genlerin yanında bulunan polimorfik markırlardaki kayıpların tanımlanması ile yapılmaktadır. Mikrosatellit PCR, LOH analizinde sıklıkla kullanılan bir metottur. Mikrosatellitler genom boyunca dağılmış 2–5 bç nükleotidlik tekrarlardan oluşan kısa ardışık DNA tekrar dizileridir. Bilgilendirici olmayan örneklerin sayısını en aza indirmek için markırların belirlenmesinde yüksek heterozigotluk oranına sahip olanları seçmek önem taşımaktadır (Velasco vd., 2008).

Eğer hasta seçilen mikrosatellit lokusu için homozigot ise PCR sonrasında mikrosatellit alleller aynı büyüklükte olmaktadır ve kapiller elektroforezde tek pik, jel elektroforezinde ise tek bant oluşmaktadır. Bu durum iki allelden birinin

kaybolmadığını göstermektedir. Normal DNA'dan mikrosatellit markırların amplifikasyonu sonucu 2 pik (kapiller elektroforezi) (Şekil 2.4) veya 2 bant (jel elektroforezi) (Şekil 2.5) görüldüğü durumlar heterozigotluk olduğunu göstermektedir. Heterozigotluk kaybının olup olmadığı aynı bireye ait normal ve tümörlü örneklerin kıyaslanması sonucu belirlenmektedir (Velasco vd., 2008).



**Şekil 2.4** Mikrosatellit PCR sonrası kapiller elektroforez analizindeki heterozigotluk kaybının görüntüsü (T: tümörlü doku, N: Normal doku) (Velasco vd., 2008)



**Şekil 2.5** Mikrosatellit PCR sonrası jel elektroforez analizindeki heterozigotluk kaybının görüntüsü (T: tümörlü doku, N: Normal doku) (Pylkkänen, 2002)

### 2.3.2.2 Karyotip Analizi

Karyotip analizi gen delesyonlarının belirlenmesinde kullanılan eski metotlardan birisidir. Bu analiz büyük delesyonların belirlenmesi için iyi bir metottur fakat metafaz safhasındaki hücrelerle sınırlıdır. Bununla beraber küçük delesyonların tespitinde yetersizdir (Velasco vd., 2008).

### **2.3.2.3 Floresans *in situ* Hibridizasyon (FISH)**

Floresans *in situ* hibridizasyon tümörlü hücrelerdeki delesyonların tanımlanmasında kullanılan metotlardan bir diğeridir. Bu metot hem metafaz hem de interfaz aşamasındaki hücreler için uygundur. Lokusa spesifik problar kullanılarak hedef gendeki delesyonlar belirlenmektedir. Karyotip analizinde olduğu gibi bu metotta da küçük delesyonların tespiti sınırlıdır (Velasco vd., 2008).

### **2.3.2.4 Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Analizi**

Bu teknikte önce; hedef gen özgül primerler kullanılarak amplifiye edilmektedir ve PCR ürünleri restriksiyon endonükleaz enzimleri (RE) ile kesilmektedir. RFLP sonucu LOH görülen örneklerde normal dokularda 2 allel de bulunurken, tümörlü dokularda allellerden biri kaybolmuştur (Velasco vd., 2008).

### **2.3.2.5 Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP)**

PCR-SSCP tekniği ile DNA'da oluşan tek baz değişikliklerini belirlemek mümkündür. Bu non-denaturan jellerde tek iplikçikli DNA'da oluşan değişimin, jelde yürüme farklılığın belirlenmesine dayanan bir tekniktir. Tümör ve normal dokuların PCR ürünlerinin SSCP analizi sonucu hedef gendeki heterozigotluk kaybı belirlenebilmektedir (Akar, 1999; Velasco vd., 2008).

## **2.4 Kaynak Özetleri**

Kolorektal kanserlerde heterozigosite kaybı ilk olarak 1989 yılında Vogelstein tarafından rapor edilmiştir (Vogelstein vd., 1989).

Choi vd. (2002) klinik ve patolojik bulgular ile LOH ve mikrosatellit instabilite (MSI) arasında bağlantının olup olmadığını araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada kolorektal kanserle ilişkili 3p, 4p, 5q, 8p, 13q, 17p ve 18q kromozomlarından seçilen 40 mikrosatellit markır kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda, kolorektal kanserin sınıflandırılmasında LOH ve MSI'nin, tümör patolojisinde prognostik bir gösterge olarak kullanılabileceğini bildirilmişlerdir.

11p11 kromozom bandı üzerinde bulunan *PTPRJ* (protein tirozin fosforaz reseptör tip J), kolorektal kanser de dahil olmak üzere birkaç kanser tipinde delesyona

uğrayan bir gendir. Ruivenkamp vd. (2003) kolorektal adenomlarda *PMP22*'nin heterozigotluk kaybı ile 18q12-21 kromozomal bölgesinin kaybı arasında etkileşim olduğunu ve bu iki olayın birlikte olması sonucunda adenom oluşumunun ilerlediğini rapor etmişlerdir.

Sporadik kolorektal kanserlerde *BRAF* lokusundaki allelik kaybın oranını araştırmak ve bunun hasta prognozundaki önemini ortaya koymak için yapılan çalışmada, Garcia vd. (2003) *BRAF* gen lokusundaki heterozigotluk kaybının I. ve II. evrelerdeki kolorektal kanserli hastalarda bağımsız prognostik faktör olabileceğini bildirmişlerdir.

Erken evredeki kolorektal kanserli 277 vakanın dahil edildiği çalışmada 4 mikrosatellit markır (D15S970, D15S117, D15S971 ve D15S1028) kullanılarak 15q14-q22 bölgesindeki allel kaybı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda %14 ile %22 arasında LOH saptanmıştır, fakat birbirine yakın olan markırlardaki LOH arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Araştırmacılar gözledikleri LOH'u 15q14-q22 bölgesinde lokalize olan ve tümör baskılayıcı bir gen olarak işlev gören *CRAC1* ile ilişkilendirmişlerdir (Popat ve ark, 2003).

Zhou vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada, sporadik kolorektal kanserli hastalara ait dokularda 1p36.31–36.33 bölgesinde yüksek oranda LOH tespit edilmiş ve bu çalışma sonucunda araştırmacılar tarafından bu bölgede sporadik kolorektal kanserle ilişkili bir tümör baskılayıcı gen olabileceği bildirilmiştir.

Primer kolorektal kanserlerde *APC* ve *DCC* genlerinin bulunduğu lokuslardaki heterozigotluk kaybı ile bu kanser vakalarındaki perikolonik lenf nodlarında meydana gelen mikrometastazların ilişkisinin araştırıldığı çalışmada, hedef lokuslardaki allelik kayıplar ile mikrometastaz arasında bir bağlantı saptanmamıştır (Zauber ve ark, 2004)

Kolorektal kanserlerde *APC* lokusundaki LOH'un araştırıldığı çalışmada LOH analizi sonucu alınan değerler ile klinik ve patolojik bulgular kıyaslanmış ve çalışılan tümör dokularının %30,1'inde LOH saptanmıştır. *APC* gen LOH'unun büyük bir çoğunluğunun Dukes'in B evresindeki (%55,6) ve orta differansiye tümörlerde olduğu tespit edilmiştir (Kapitanovic vd., 2004).

Cacev vd. (2005) kolondaki tümörlü ve normal dokularda, NF1 geninin bulunduğu 17q11.2 lokusundaki heterozigosite kaybını ve NF1 mRNA ekspresyon düzeylerini araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda tümörlü dokularda %20,7 oranında LOH gözlemişler ve NF1'in kolon kanserinin gelişmesi ve ilerlemesinde bir rolü olabileceğini bildirmişlerdir.

22. kromozomun uzun kolu üzerinde de heterozigosite kaybını araştırmak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda bu kromozom üzerinde oral (% 40), beyin (% 40), ovaryum (% 55), meme (% 40), pankreatik endokrin (% 30) tümörler ve gastrointestinal (% 77) tümörlerde LOH gözlenmiştir. Bununla beraber Zheng vd. (2005) yaptıkları çalışmada kolorektal kanserde de 22q13 bölgesinde ortalama %28,38 oranında bir allelik kayıp olduğu bildirilmiştir.

Kolorektal kanser oluşumunda etkili olan genlerin bulunduğu bölgeler ile bu bölgelerin yakınlarından seçilen 14 genetik lokusda, mikrosatellit instabilite ve LOH'un prognostik değeri ve sıklığını araştıran Chang vd. (2005), çalışmalarında 207 hasta kullanmışlardır. Bu hastalara ait tümörlü ve normal dokularda HPC1, hMSH2, hMLH1, APC, MET, P53, NH23-H1, DCC, BAT25, BAT26, D17S250, MYCL1 ve D8S254 bölgelerindeki LOH ve mikrosatellit kararsızlık analiz edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışma kapsamında elde edilen LOH ve mikrosatellit instabilite ile klinik ve patolojik bulgular da kıyaslanmıştır. Çalışmanın sonucunda hastaların %78,8'inde en az bir mikrosatellit markırda LOH gözlenmiştir. LOH'un en yüksek sıklıkta görüldüğü bölgeler tümör baskılayıcı genlerin bulunduğu lokuslar olarak tespit edilmiştir (TP53.alu (%65), DCC (%64,3), D8S254 (%51,7) ve APC (%47,8)). Çalışma sonucunda metastatik potansiyele sahip kolorektal kanserler ile yüksek sıklıktaki LOH arasında ilişki olduğu bildirilmiştir.

Toplam 425 kolorektal kanserli hastayı kapsayan, genom boyunca heterozigotluk kaybının araştırıldığı 7 çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda 17p (%28), 18p (%26), 18q ve 5q (%25), 9q ve 15q (%24), 8p (%23) ve 14q (%20)' da sık allelik kayıplar olduğu saptanmıştır. Bu allelik kayıpların hepsi, karyotip (G bantlama) ve CGH (Comparative genomic hybridization) analizleri ile tespit edilen kromozomal kayıpların olduğu bölgelerle paralellik göstermektedir. Yapılan bu çalışmalarda farklılıklarda gözlenmiştir, bununla beraber HNPCC'de ortak olarak gözlenen LOH bölgeleri de (11p ve 11q) tespit edilmiştir (Mao vd., 2006).

Mao vd. (2006) FAP adenomlarında 5 ortak allelik kayıp olan bölge tespit etmişlerdir. Bu kromozomal bölgeler 17p (%41), 18p (%38), 10p (%32), 2p (%29) ve 16q (%27)' dur. Aynı çalışmada sporadik kolorektal karsinoadenomlarda da 4q (%42), 1p (%36), 11q (%31), 17p (%28), 18 p (%26) ve 1q (%25) olmak üzere 6 farklı LOH bölgesi saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen veriler ile daha önce yapılan kolorektal kanserlerdeki moleküler ve sitogenetik çalışmalar birbirlerine benzer sonuçlar göstermektedir.

Aktive olan *Ras* proto-onkogenleri, özellikle *Kras2*, karsinogenezde önemli bir rol oynamaktadır. Meme, rektum, böbrek, mide, pankreas, ovaryum, akciğer ve karaciğer tümörlerinde *Kras2* geninde mutasyon meydana geldiği saptanmıştır (Wan vd., 2006). Wan vd. (2006) yaptıkları çalışmada tümörlü kolon dokularında, *Kras2* geninin de lokalize olduğu 12p12–13 kromozom bölgesinde allelik kayıplar olduğunu gözlemişlerdir. Fakat bu allelik kayıplar ile hastaların yaşı, cinsiyeti, tümör büyüklüğü ve kanserli hücrelerin metastazı arasında bir korelasyon saptanmamıştır.

Orita vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada erken evre flat-type kolorektal tümörlerde 17p'de % 92, 18q'da % 81, 18p'de % 81, 5q'da % 61, 22q'da % 51, 14q'da % 44, 15q'da % 41, 2q'da % 39, 12q'da % 36 ve 4q'da % 32 oranlarında heterozigotluk kayıpları tespit edilmiştir.

Sporadik kolorektal karsinomlarla ilişkili 1q31.1-32.1 kromozom bölgesindeki aday tümör baskılayıcı genleri taramak ve delesyona uğrayan genleri belirlemek amacıyla 83 kolorektal kanserli hastaya ait tümörlü ve normal dokunun kullanıldığı çalışmada 6 polimorfik markır seçilerek heterozigotluğun kaybı araştırılmıştır. Çalışmada tümörlü dokularda 1q31.1–32.1 bölgesinde yüksek oranda heterozigosite kaybı saptanmıştır. Seçilen her bir markırdaki LOH ile klinik ve patolojik bulgular (cinsiyet, yaş, tümör büyüklüğü ve tümörün bulunduğu evre) arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Çalışmanın sonucunda hedef alınan bölgede tümör baskılayıcı genlerin olabileceği düşünülmüştür. 1q31.1-32.1 kromozom bölgesinde lokalize olan ve daha önceki yapılan çalışmaların ışığı altında bu genin *CSR1* geni olabileceği sonucuna varılmıştır (Zhou vd., 2008).

Kolorektal kanserlerde 18q21 bölgesindeki LOH'un lenf nod metastazı ile ilişkili olup olmadığını saptamak amacıyla yapılan çalışmada 2 polimorfik mikrosatellit



markır (D18S46 ve D18S474) kullanılmıştır. Çalışmada lenf nod metastazı görülmeyen kanserli hastalara oranla metastaz görülen hastalarda 18q21'de gözlenen allelik kaybın daha yüksek olduğu saptanmış ve bu mikrosatellit markırların hastalığın seyrini belirlemede kullanılabilecek moleküler belirteçler olabileceği kanısına varılmıştır (Tanaka vd., 2008).

in'de Zheng vd. (2008) tarafından sporadik kolorektal kanserli hastalarda kromozom 4p üzerinde, seçilen 7 mikrosatellit markır (D4S2935, D4S1599, D4S303, D4S3013, D4S391 ve D4S405) ile heterozigotluk kaybı araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmanın sonucunda D4S3013 (4p15.2) ve D4S405 (4p14) lokuslarında yüksek sıklıkta LOH gözlenmiştir. Hastalara ait klinik ve patolojik bulgularla allelik kayıp arasında herhangi bir ilişkiye saptanmamıştır.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1 MATERYAL**

##### **3.1.1 Doku Örneklerinin Elde Edilmesi**

Çalışmaya 40'ı parafine gömülü 7'si taze olmak üzere toplam 47 kolorektal kanser tanısı konmuş hastaya ait normal ve tümörlü doku örneği dahil edilmiştir. Bu hastalara ait örnek numaraları, yaş, cinsiyet, örneğin alındığı yer ve evre bilgileri Tablo 3.1'de, bu özelliklerin genel dağılımı Tablo 3.2'de verilmiştir. Taze doku örnekleri Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji ve Gastroenteroloji Anabilim Dallarına başvuran hastalardan bilimsel ve etik kurallar çerçevesinde alındı. Bu noktada tüm hastalara gönüllülük formu verildi ve imzalandıktan sonra doku örneklerin alınarak araştırmalarda kullanılması sağlandı. Parafine gömülü doku örnekleri ise Ankara Genel Patoloji Merkezinden temin edildi. Her bir numunenin alındığı hasta ile ilgili etik kurallar ve örneklerin ilk alınmaları ile bize ulaşıncaya kadarki tüm sorumluluk Genel Patoloji Merkezine aittir.

Çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurulu'nun 05.03.2008 tarih ve 03–2005/15 sayılı kararı ile uygun görülmüştür.

**Tablo 3.1** Kolorektal kanser tanısı konmuş hastalara ait örnek numaraları, cinsiyet, yaş, örneğin alındığı yer ve patolojik evre bilgileri

Örnek No	Cinsiyet	Yaş	Örneğin Alındığı Yer	Patolojik Evre
1	E	72	Sigmoid kolon	Evre III
2	K	80	Sigmoid kolon	Evre II
3	E	80	Sol kolon	Evre II
4	E	72	Sol kolon	Evre II
5	K	65	Sigmoid kolon	Evre II
6	K	57	Kolon	Evre II
7	E	45	Rektum	Evre III
8	K	40	Sigmoid kolon	Evre II
9	E	27	Sigmoid kolon	Evre IV
10	K	49	Kolon	Evre II
11	E	57	Sol kolon	Evre II
12	E	82	Rektosigmoid	Evre II
13	E	69	Sol kolon	Evre IV
14	E	75	Sol kolon	Evre IV
15	E	64	Sigmoid kolon	Evre III
16	K	63	Sağ kolon	Evre III
17	E	55	Sol kolon	Evre II
18	K	54	Sol kolon	Evre III
19	E	69	Rektosigmoid	Evre II
20	E	83	Sigmoid kolon	Evre III
21	E	92	Kolon	Evre II
22	E	41	Rektum	Evre II
23	E	73	Transvers kolon	Evre III
24	K	72	Rektosigmoid	Evre II
25	E	63	Sigmoid kolon	Evre IV
26	K	67	Sol kolon	Evre III
27	E	62	Transvers kolon	Evre III
28	E	61	Sol kolon	Evre II
29	E	70	Sol kolon	Evre II
30	K	48	Rektum	Evre II
31	E	54	Rektum	Evre II
32	E	16	Sigmoid kolon	Evre III
33	E	80	Sigmoid kolon	Evre II
34	E	57	Transvers kolon	Evre II
35	E	70	Sigmoid kolon	Evre II
36	E	53	Sigmoid kolon	Evre IV
37	K	68	Sigmoid kolon	Evre II
38	E	57	Rektum	Evre III
39	E	29	Sigmoid kolon	Evre IV
40	K	65	Sigmoid kolon	Evre II
41	K	62	Sigmoid kolon	Evre III
42	K	77	Rektum	Evre III
43	K	38	Rektum	Evre II
44	E	65	Sol kolon	Evre II
45	E	57	Sigmoid kolon	Evre II
46	E	53	Rektum	Evre II
47	E	58	Rektum	Evre III

(1–40 nolu örnekler; parafine gömülü doku örnekleri, 41–47 nolu örnekler taze doku örnekleri)

**Tablo 3.2** Hastalara ait özelliklerin genel dağılımı

➤ Yaş		➤ Cinsiyet	
< 50	% 19 (9/47)	Kadın	% 32 (15/47)
> 50	% 81 (38/47)	Erkek	% 68 (32/47)
➤ Tümör Yerleşimi		➤ Patolojik Evre	
Sağ (çıkan) kolon	% 2,1 (1/47)	Evre II	% 57,4 (27/47)
Transvers (yatay) kolon	% 6,4 (3/47)	Evre III	% 29,8 (14/47)
Sol (inen) kolon	% 23,4 (11/47)	Evre IV	% 12,8 (6/47)
Kolon	% 6,4 (3/47)		
Sigmoid kolon	% 36,2 (17/47)		
Rektosigmoid kolon	% 6,4 (3/47)		
Rektum	% 19,1 (9/47)		

### 3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Agaroz (Bio Basic Inc., Kanada), Akrilamid (Himedia, Hindistan),  $\gamma$ -Methacryloxypropyl-trimethoxysilane (Sigma-Aldrich- Almanya), Amonyum persülfat (APS) (Merck, Almanya), Asetik asit (Sigma-Aldrich, Almanya), Bis-akrilamid (Sigma, Almanya), Borik asit (Merck, Almanya), Bromfenol mavisi (Merck, Almanya), DNA uzunluk markırı (Bio Basic Inc., 50bp-1000bp, Cat:GM345, Kanada), EDTA (Merck, Almanya), Etidyum bromür (Merck-Almanya), Etanol (Merck-Almanya), FastStart PCR Master Kiti (Roche-Almanya), Formaldehit (Merck-Almanya), Formamid (Merck-Almanya), Gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) (Merck-Almanya), High Pure PCR Template Preparation Kiti (Roche-Almanya), Ksilen siyanol (Sigma, Almanya), Ksilol (Merck-Almanya), Jel yükleme tamponu (Takara, Amerika), Primerler (Integrated DNA Technologies, USA),

Sigmacota (Sigma-Aldrich- Almanya), Sodyum karbonat (Sigma-Aldrich- Almanya), Sodyum tiyosülfat (ZAG- Türkiye), TEMED (Himedia, Hindistan), Tris Base (Merck, Almanya)

### 3.1.3 Kullanılan Cihazlar

Çalkalayıcı (Selecta, İspanya), Derin dondurucu (Uğur, Türkiye), Dikey elektroforez sistemi (Owl Separation System, Model: S13S, Amerika), Etüv (Nüve, Türkiye), Güç kaynakları (Clever Scientific Ltd., İngiltere- Bio Rad-Power PAC 3000, Amerika), Hassas Terazî (Denver Instrument, Almanya), Homojenizatör (Wisetis HG-15D, Amerika), Jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Fransa), Manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica, İtalya), Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye), Mikrotom (Leica RM2125RT, Amerika), Otoklav (Nüve, Türkiye), Otomatik pipetler (Ependorf- Almanya, CAPP-Danimarka), pH metre (Hanna Instruments, Amerika), Saf su cihaz (Microline), Santrifüjler (Selecta, İspanya), Spektrofotometre (Nanodrop, ND-1000, Amerika), Termal döngü cihazı (Takara- Amerika, MJ research- Amerika), Vorteks (Velp Scientifica, İtalya), Yatay elektroforez sistemi (Clever Scientific Ltd., İngiltere)

### 3.1.4 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

#### **Agaroz ve Poliakrilamid Jel Elektroforez Tamponları**

10xTBE (Tris-Borat-EDTA Tamponu) (pH:8,3):	Tris Base	108 g/l
	Borik asit	55 g/l
	EDTA	8,3 g/l

Etidyum bromür: 10mg/ml

#### **%2'lik Agaroz Jel**

%2 Agaroz

1X TBE

0,25 mg/ml Etidyum bromür

### **%3'lük Agaroz Jel**

%3 Agaroz

1X TBE

0,25 mg/ml Etidyum bromür

### **Jel Yükleme Tamponları**

6X Loading buffer

Formamidli Yükleme Tamponu:	Bromofenol mavisi	0,025 g
	Ksilen siyanol	0,025 g
	Formamid	8 ml
	ddH <sub>2</sub> O	2 ml

### **Bağlama Çözeltisi**

1000 µl % 96'lık alkol

5 µl Asetik asit

3 µl Bağlama solüsyonu ( $\gamma$ -Methacryloxypropyl-trimethoxysilane)

### **% 8' lik Denatüre-Edici Poliakrilamid Jel**

Üre	42 g
% 50'lik Akrlamid/ Bis-akrilamid Çözeltisi (19:1)	16 ml
10X TBE	10 ml
% 10'luk APS	400 µl
TEMED	40 µl

dH<sub>2</sub>O ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlanır.

### **Gümüş Boyama Çözeltileri**

% 10'luk Asetik Asit

Gümüş Nitrat Çözeltisi:	AgNO <sub>3</sub>	2 g
	Formaldehit	2,5 ml
	dH <sub>2</sub> O	2 l

Sodyum Karbonat Çözeltisi:	Sodyum karbonat	58 g
	Sodyum tiyosülfat (10mg/ml)	420 µl
	Formaldehit	2,5 ml
	dH <sub>2</sub> O	1,9 l

### **PCR'da Kullanılan Markırlara Ait Primer Dizileri**

#### **D12S83 Markırı için:**

**İleri primer:** 5'- TTTTGGGAAGTCTATCAATTTGA- 3'

**Geri primer:** 5'- TAGCAGAGAAAGCCAATTCA- 3'

**PCR Ürünü Büyüklüğü:** 85–99 bç

#### **D12S1660 Markırı için:**

**İleri primer:** 5'- GTTTGACACAAGTACACCAAGTCAC- 3'

**Geri primer:** 5'- AAGTACCAGCCTATTTTTTTGGACC- 3'

**PCR Ürünü Büyüklüğü:** 196–226 bç.

#### **D12S346 Markırı için:**

**İleri primer:** 5'- TGCCCACCTGCCTGTAAC- 3'

**Geri primer:** 5'- AATGGAGGGTAAATGCCCG- 3'

**PCR Ürünü Büyüklüğü:** 154–174 bç

#### **D12S78 Markırı için:**

**İleri primer:** 5'- CTTTGCAGCACCATGTATTT - 3'

**Geri primer:** 5'- ACTGCTGGCTTTAACAGAAA- 3'

**PCR Ürünü Büyüklüğü:** 171–201 bç

#### **D12S129 Markırı için:**

**İleri primer:** 5'- ATGTGTGTGTTTTTCCCAAGG- 3'

**Geri primer:** 5'- CAGCATCTTCATGCCACG- 3'

**PCR Ürünü Büyüklüğü:** 159–194 bç

## 3.2 YÖNTEM

### 3.2.1 DNA İzolasyonu

Parafine gömülü doku örneklerinden mikrotomda 5µm kalınlığında 10-15 adet kesitler alındı. Kesit alırken mikrotomun temiz olmasına, mikrotom bıçağının her kullanım sonunda değiştirilip, alkolle temizlenmesine dikkat edildi. Kesitler 1.5 ml'lik steril ependorf tüpler içerisine alındı ve DNA izolasyonu Roche Applied Science, High Pure PCR Template Preparation Kiti (Cat. No. 11 796 828 001) kullanılarak yapıldı (Vogelstein ve Gillespie, 1979; Bandea vd., 2001; Lee vd., 2001; Reischl vd., 2003; Mayall vd., 2003; Kamory vd., 2004; Slowik vd., 2004). DNA izolasyonu öncesi dokulardan parafinin uzaklaştırılması sağlandı. Bunun için Roche Applied Science, High Pure PCR Template Preparation Kitinde verilen metot modifiye edilerek laboratuvar ve örnek koşullarına adaptasyonu sağlandı. Optimizasyon çalışmaları sonucunda oluşan metod aşağıdaki gibidir:

1. Kesitlerin bulunduğu 1,5 ml'lik tüplerin içerisine 1200 µl ksilol (parafini çözmek ve uzaklaştırmak için) ilave edildi ve 55 °C'de 1 saat bekletildi. Mikrosantrifüjle 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı.
2. Parafinin tamamen uzaklaşması için 1. basamakta verilen işlem 1000 µl ksilol kullanılarak 3 kez tekrarlandı.
3. Yıkama basamağı için tüplerin her birine, 1000 µl % 96'lık etanol (ksilölü uzaklaştırmak için) eklendi. Tüpler 2-3 dakika alt üst edilerek karıştırıldı ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı.
4. Daha sonra tüplere sırasıyla % 80'lik, % 60'lık ve % 40'lık etanol eklenerek her farklı alkol konsantrasyonunda 3. basamakta verilen işlemler tekrarlandı.
5. Yıkama basamağında son olarak 1000 µl ddH<sub>2</sub>O (etanölü uzaklaştırmak için) eklendi. Tüpler 2-3 dakika alt üst edilerek karıştırıldı ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı.



Parafini uzaklaştırılan doku örneklerinden DNA izolasyonu işleminde aşağıdaki verilen basamaklar uygulandı:

1. Doku örnekleri 1,5 ml'lik tüp içerisine alındı ve üzerine 200 µl Doku lizis tamponu ve 60 µl Proteinaz K eklendi. Tüp 2–3 dakika alt üst edilerek karıştırıldı ve doku tamamen parçalanana kadar 37 °C'de 1 gece boyunca inkübe edildi.
2. 30 µl Proteinaz K eklendi ve 55 °C'de 2 saat inkübe edildi.
3. 200 µl Bağlama tamponu eklendi ve 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
4. 100 µl izopropanol eklendi, iyice karıştırıldı ve kolonların içerisine yerleştirilen spinlere aktarıldı. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi ve kolondaki süpernatant uzaklaştırıldı.
5. 500 µl İnhibitör uzaklaştırıcı tampon eklendi. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi ve kolondaki süpernatant uzaklaştırıldı.
6. 500 µl Yıkama tamponu eklendi. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi ve kolondaki süpernatant uzaklaştırıldı.
7. 6. basmakta verilen işlem tekrarlandı.
8. Spinler 1,5 ml'lik ependorf tüpleri içerisine yerleştirildi ve 70 °C'de ısıtılmış olan Elüsyon tamponundan 200 µl eklendi. 1 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüj edildi, spinler atılarak içerisinde DNA bulunan tüpler ayrıldı.

Hastalardan taze olarak alınan normal ve tümörlü doku örnekleri içerisinde 1 ml trizol bulunan steril tüplere alındı. Bu örneklerden DNA izolasyonu bekletilmeden aynı gün içerisinde yapıldı. Tüplerde trizol içerisinde bulunan örnekler iyice parçalanana kadar homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Bu işlem örneklerin fazla ısıdan dolayı bozulmamaları için buz üzerinde gerçekleştirildi. DNA izolasyonu Roche Applied Science, High Pure PCR Template Preparation Kiti (Cat. No. 11 796 828 001) kullanılarak yapıldı (Vogelstein ve Gillespie, 1979; Bandea vd., 2001; Lee vd., 2001; Reischl vd., 2003; Mayall vd., 2003; Kamory vd., 2004; Slowik vd., 2004)

ve yukarıda verilen parafine gömülü doku örnekleri için uygulanan protokol uygulandı.

İzole edilen DNA örnekleri  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### 3.2.2 Spektrofotometrik Analiz

DNA örneklerinin konsantrasyonu spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda optik yoğunlukları okunarak belirlendi. Örneklerin saflığı ise 260 ve 280 nm dalga boylarındaki optik yoğunluk değerleri oranlanarak belirlendi.

### 3.2.3 Kromozom 12q13–24 Üzerinde Heterozigotluk Kaybının (LOH) Araştırılması

Çalışmada kolorektal kanserli 47 hastaya ait tümörlü ve normal dokudan izole edilen DNA örneklerinde D12S83 (12q13.2), D12S1660 (12q21.2), D12S346 (12q23.1), D12S78 (12q23) ve D12S129 (12q24) polimorfik markırları kullanılarak kromozom 12q13–24 bölgesindeki heterozigotluk kaybı araştırıldı. Çalışmada belirlenen polimorfik markırlar ve bu markırlara ait primer dizileri Genome Database'den (<http://www.gdb.org/gdb/>) sağlandı.

PCR işlemi için kullanılan reaksiyon içeriği Tablo 3.3'de verilmiştir.

**Tablo 3.3** Standart olarak kullanılan bir PCR örneği

Reaksiyon içeriği	Miktar	Final Konsantrasyonu
Master Mix, 2X	12,5 $\mu\text{l}$	1X
İleri Primer (10 $\mu\text{M}$ )	1,5 $\mu\text{l}$	300 nM
Geri Primer (10 $\mu\text{M}$ )	1,5 $\mu\text{l}$	300 nM
ddH <sub>2</sub> O	1,5 $\mu\text{l}$	
<i>17 <math>\mu\text{l}</math>'lik reaksiyon karşıtı</i>		
Genomik DNA	8 $\mu\text{l}$	
<i>Toplam hacim: 25 <math>\mu\text{l}</math></i>		

PCR döngüleri Tablo 3.4'de verilmiştir.

**Tablo 3.4** D12S83, D12S1660, D12S346, D12S78 ve D12S129 polimorfik bölgelerini çoğaltmak için kullanılan PCR döngüsü

<b>Denatürasyon</b>	94 °C’de	5 dakika
	94 °C’de	1 dakika
<b>Döngü</b>	50 °C’de	1 dakika
	72 °C’de	1 dakika
<b>Sonlanma</b>	72 °C’de	7 dakika
<b>Döngü sayısı</b>	40	

### 3.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerinin incelenmesi için %2’lik ve %3’lük agaroz jeller kullanıldı. Agaroz jel 1xTBE tamponu içinde mikrodalga fırında kaynatılarak hazırlandı. DNA örneklerinin UV ışık altında izlenebilmesi için agaroz jel çözeltisinin içine 25 µl etidyum bromür (10mg/ml) eklendi. Çözelti 56 °C’ye soğutulduktan sonra jel tabağına kalınlığı yaklaşık 5 mm olacak şekilde döküldü. Jel polimerize olduktan sonra 1xTBE tamponu içeren elektroforez tankına alındı. 3 µl PCR ürünü 4 µl yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jele yüklendi. Örnekler 120 V’da yaklaşık 27 dakika yürütüldükten sonra UV ışık altında incelendi.

### 3.2.5 Poliakrilamid Jel Elektroforezi

#### 3.2.5.1 Camların Hazırlanması

Kullanılacak olan, düz ve U şekilli camlar ilk önce %70’lik alkolle, ardından %96’lık alkolle iyice temizlendi. Camlar temizlendikten sonra her defasında kullanılmadan önce taze olarak hazırlanan 2 ml bağlama çözeltisi, jelin cama yapışması için düz cama hav bırakmayan bir peçete ile iyice yayıldı. U cama da jelin yapışması önlemek için 1400 µl kayganlaştırıcı çözelti (sigmacota) hav bırakmayan bir peçete ile iyice yayıldı. Yayılan çözeltilerin kuruması için 10 dakika beklendi. Yanlara aralayıcılar, alt tarafa tarak ters olarak yerleştirildikten sonra camlar kapatılıp mandallar ile birbirlerine tutturuldu (İğci, 2004).

### 3.2.5.2 Jelin Hazırlanması

Jel karışımı 250 ml'lik beher içerisinde %8'lik 19:1 akrilamid/bisakrilamid oranında hazırlandı. 42 g üre, 16 ml akrilamid/bisakrilamid (19:1) çözeltisi, 10 ml 10X TBE ve 20 ml dH<sub>2</sub>O beher içerisine alındı ve manyetik karıştırıcı üzerinde üre çözülene kadar karışması sağlandı. Karışım homojen hale geldikten sonra dH<sub>2</sub>O ile toplam hacim 100 ml tamamlandı. Son olarak 400 µl %10'luk APS ve 40 µl TEMED eklendi. 9–10 saniye karışması beklendikten sonra jel beher yardımıyla yavaşça ve hava kabarcığı bırakmamaya özen göstererek iki cam arasına döküldü ve kuyucukları oluşturacak olan tarak iki camın arasına dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Jelin polimerizasyonu için en az 1 saat beklendi (Sambrook ve Russell, 2001; İğci, 2004).

### 3.2.5.3 Örneklerin Hazırlanması

Örnekler 0,2 ml'lik PCR tüpleri içerisinde hazırlandı. 5 µl PCR ürünü ve 7 µl formamidli yükleme tamponu ile karıştırılıp 95 °C'de 5 dakika denatüre edildi. Denatürasyonun hemen ardından buz üzerine alınan örnekler zaman kaybetmeden hızlı bir şekilde jele yüklendi (İğci, 2004).

### 3.2.5.4 Örneklerin Jele Yüklenmesi

Jel polimerize olduktan sonra, mandallar ve taraklar çıkarıldı. U cam arkada kalacak şekilde, camlar elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın alt ve üst kısımları 1X TBE ile dolduruldu. Güç kaynağı ile bağlantılar yapılarak 80 Watt'ta 30 dakika boyunca pH dengesinin sağlanması amacıyla ön yürütme yapıldı. Ön yürütmenin ardından, hazırlanan örneklerden 8'er µl kuyucuklara yüklendi ve 80 Watt'ta 2,5 saat yürütüldü (Sambrook ve Russell, 2001; İğci, 2004).

### 3.2.6 Gümüş Boyama Yöntemi

Yürütmenin ardından tanktan alınan camlar birbirinden ayrıldı. Düz cam üzerine yapışan jellerin boyanması aşamasında aşağıda verilen akış şeması uygulandı.

Jel;

1. % 10'luk asetik asit içinde 15 dakika bekletildi.
2. Distile su içinde 10 dakika boyunca yıkandı.
3. 45 dakika boyunca gümüş nitrat çözeltisi içerisinde bekletildi.

4. Distile su içinde yaklaşık 1 dakika yıkandı.
5. Bantlar görünür hale gelinceye kadar soğuk olarak hazırlanmış sodyum karbonat çözeltisi içerisinde bekletildi.
6. %10'luk asetik asit içinde 5 dakika bekletildi.
7. Distile su içinde 30 dakika boyunca yıkandı.
8. Jel kurumaya bırakıldı.

(1–7 arasındaki basamaklar çalkalayıcı üzerinde yapıldı) (Sambrook ve Russell, 2001).

Kurumanın ardından, jelin görüntüsü 1200 dpi tarayıcı kullanılarak bilgisayara aktarıldı.

### 3.2.7 Sonuçların Değerlendirilmesi

Gümüş boyama ile görünür duruma getirilen DNA bantlarının görüntüleri bilgisayara aktarıldıktan sonra ImageJ programı kullanılarak analiz edildi (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Bilgisayar ekranında ImageJ programında değerlendirilen DNA bantları pikler şeklinde görülmektedir. Aynı hastaya ait normal ve tümörlü DNA örneklerinin oluşturdukları piklerin büyüklükleri karşılaştırılarak LOH analizi gerçekleştirildi. LOH varlığının veya yokluğunun gösterilebilmesi için aşağıda belirtilen matematiksel işlem uygulandı.

$$LOH = \frac{\frac{\text{Normal allel I}}{\text{Normal allel II}}}{\frac{\text{Tümör allel I}}{\text{Tümör allel II}}}$$

Normal allel I: Normal doku DNA'sının I. allelinin oluşturduğu pikin yüksekliği

Normal allel II: Normal doku DNA'sının II. allelinin oluşturduğu pikin yüksekliği

Tümör allel I: Tümör doku DNA'sının I. allelinin oluşturduğu pikin yüksekliği

Tümör allel II: Tümör doku DNA'sının II. allelinin oluşturduğu pikin yüksekliği

Eğer LOH değeri,  $\leq 0,5$  ise; tümör örneğinin II. allelinde,  $\geq 1,5$  ise; tümör örneğinin I. allelinde LOH varlığını göstermektedir.

### **3.2.8 Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi**

LOH ile klinik-patolojik bulgular (cinsiyet, yaş, örneğin alındığı yer ve patolojik evre bilgileri) arasındaki ilişkinin belirlenmesi ve odds oranlarının hesaplanması için lojistik regresyon ve ki-kare analizleri kullanıldı. Analizler SPSS for Windows 11.5 paket programı yardımıyla yapıldı. *p* değeri 0,05'den küçük olanlar anlamlı olarak değerlendirildi.

#### **4. BULGULAR**

Çalışmada 40'ı parafine gömülü 7'si taze olmak üzere toplam 47 kolorektal kanser tanısı konmuş hastaya ait normal ve tümörlü doku örneği incelenmiştir. Dokulardan DNA izolasyonu yapılmış ve izole edilen DNA'ların saflıkları ve konsantrasyonları spektrofotometrik ölçümler sonucunda belirlenmiştir. Kromozom 12q13–24 bölgesindeki heterozigotluk kaybını belirlemek amacıyla ilgili bölgeden seçilen polimorfik mikrosatellit markırlar ile PCR yapılmıştır. Agaroz jel elektroforezi ile PCR sonucu elde edilen ürünlerin görüntülenmesi sağlanmıştır. Amplifiye edilen PCR ürünleri poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülmüş ve jelin görüntülenmesi için gümüş boyama yöntemi uygulanmıştır. Sonuçlar aynı hastaların normal ve tümörlü dokularından elde edilen veriler kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Hastalara ait klinik-patolojik özellikler (cinsiyet, yaş, örneğin alındığı yer ve patolojik evre) ile her bir markırda tespit edilen LOH arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

##### **4.1 İzole Edilen DNA'ların Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları**

Kolorektal kanserli hastalara ait normal ve tümörlü dokulardan elde edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometre ile tayin edilmiştir. Spektrofotometrik ölçüm sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir.

**Tablo 4.1** Kolorektal kanserli hastalara ait normal (N) ve tümörlü (T) dokulardan elde edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçüm sonuçları (OD: optik dansite)

Örnek No		Miktar (ng/µl)	OD 260/280
1	T	184,4	2,00
	N	122,1	1,69
2	T	147,9	0,95
	N	98,8	1,73
3	T	137,6	1,54
	N	50,5	2,15
4	T	225,0	1,56
	N	135,7	1,65
5	T	235,3	1,66
	N	323,7	2,51
6	T	93,9	1,98
	N	83,7	1,87
7	T	124,8	1,62
	N	174,4	1,45
8	T	182,9	1,54
	N	121,0	1,66
9	T	75,0	0,82
	N	29,8	1,80
10	T	44,3	2,01
	N	130,4	1,51
11	T	103,2	0,82
	N	46,5	0,85
12	T	133,4	1,78
	N	165,8	1,54
13	T	59,7	1,49
	N	113,7	1,40
14	T	118,6	1,71
	N	47,4	2,21
15	T	149,5	1,90
	N	27,4	1,82
16	T	170,5	1,66
	N	95,6	1,85
17	T	56,8	1,67
	N	46,3	1,72
18	T	168,5	1,76
	N	146,8	1,58
19	T	82,7	1,84
	N	53,1	2,02
20	T	66,5	1,95
	N	138,5	1,48
21	T	188,9	1,82
	N	105,1	1,85
22	T	75,5	2,01
	N	60,4	1,92
23	T	200,3	1,75
	N	92,6	1,76
24	T	70,4	1,99

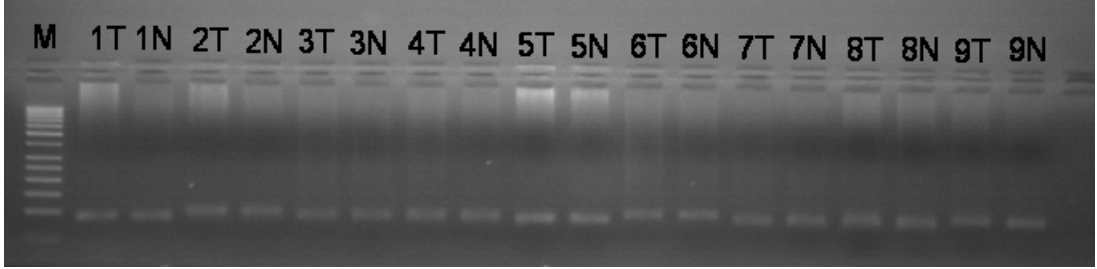
Örnek No		Miktar (ng/µl)	OD 260/280
25	N	75,1	1,86
	T	153,6	1,65
26	N	87,5	1,84
	T	167,8	1,53
27	N	63,6	1,98
	T	114,6	1,60
28	N	112,4	1,87
	T	52,1	2,05
29	N	49,9	1,76
	T	57,5	2,18
30	N	191,2	1,46
	T	147,5	1,66
31	N	163,4	1,81
	T	238,7	1,62
32	N	159,8	1,58
	T	217,9	1,54
33	N	85,8	2,89
	T	216,9	1,71
34	N	167,0	1,59
	T	158,7	1,68
35	N	91,2	1,90
	T	202,4	1,92
36	N	57,0	1,78
	T	42,9	2,00
37	N	65,3	1,81
	T	101,2	1,76
38	N	116,8	1,84
	T	168,0	1,77
39	N	106,0	1,76
	T	163,6	1,87
40	N	101,6	1,78
	T	239,2	1,86
41	N	100,3	1,82
	T	32,7	2,07
42	N	86,9	2,06
	T	22,6	1,58
43	N	36,7	1,94
	T	270,9	1,46
44	N	234,6	1,48
	T	35,3	1,50
45	N	141	1,49
	T	130,4	1,52
46	N	201,4	1,49
	T	125,9	1,98
47	N	129,3	1,95
	T	76,5	1,88
47	N	86,7	2,02



#### 4.2 D12S83, D12S1660, D12S346, D12S78 ve D12S129 Markırlarına Özgül Primerler Kullanılarak Gerçekleştirilen PCR Sonuçları

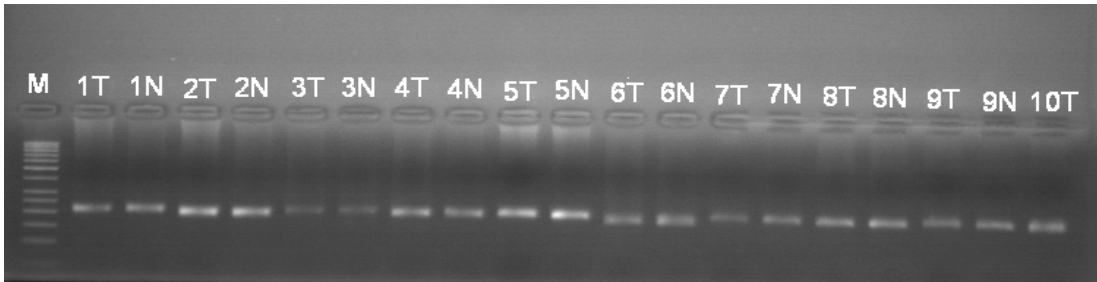
Çalışmaya dahil edilen 47 kolorektal kanserli hastaya ait normal ve tümörlü dokulardan DNA izolasyonu yapılmıştır. Kromozom 12q13-24 bölgesindeki heterozigotluk kaybını araştırmak amacıyla bu bölge içerisinde seçilen 5 polimorfik markır (D12S83, D12S1660, D12S346, D12S78 ve D12S129) kullanılarak PCR yapılmıştır.

D12S83 bölgesinin PCR'ı sonucu 85–99 bç büyüklüğünde ürünler elde edilmiştir. Bu PCR ürünleri % 3'lük agaroz jel elektroforezinde 120 V'da 27 dakika boyunca yürütülmüş ve UV ışık altındaki görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



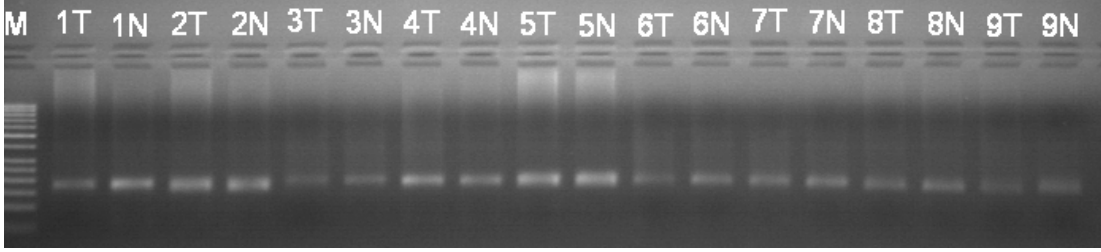
**Şekil 4.1** D12S83 bölgesinin PCR'ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü (M:Markır (50-100-150-200-250.....1031 bp), T:Tümörlü doku, N:Normal doku, 1T:1 nolu örneğe ait tümör dokusu, 1N:1 nolu örneğe ait normal doku)

D12S1660 polimorfik bölgesinin çoğaltılması için yapılan PCR sonucunda 196–226 bç büyüklüklerinde ürünler elde edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel elektroforezinde 120 V'da 27 dakika süresince yürütülmüş ve örnek jel görüntüsü Şekil 4.2'de verilmiştir.



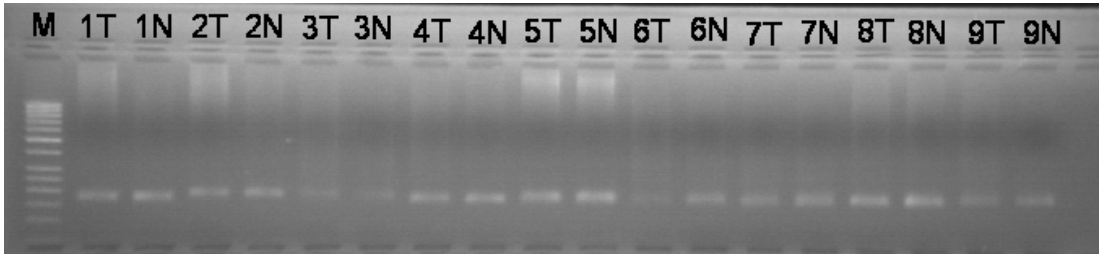
**Şekil 4.2** D12S1660 bölgesinin PCR'ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü (M:Markır(50-100-150-200-250.....1031 bp), T:Tümörlü doku, N:Normal doku, 1T: 1 nolu örneğe ait tümör dokusu, 1N: 1 nolu örneğe ait normal doku)

D12S346 bölgesinin PCR'ı sonucu 154–174 bç büyüklüğünde ürünler elde edilmiştir. Bu PCR ürünleri %2'lük agaroz jel elektroforezinde 120 V'da 27 dakika boyunca yürütülmüş ve örnek jel görüntüsü Şekil 4.3'de verilmiştir.



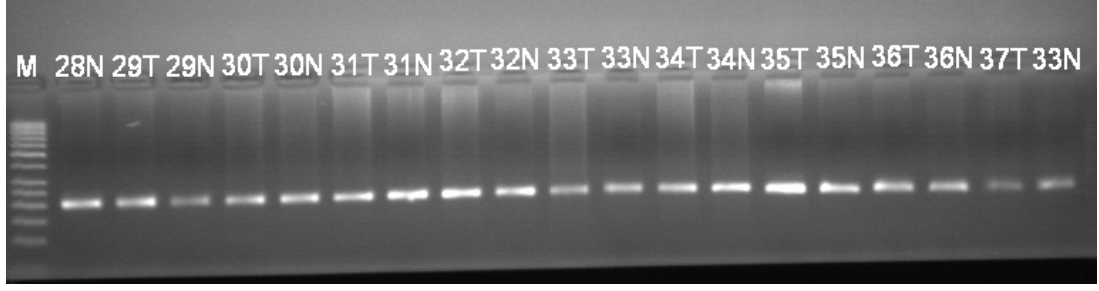
**Şekil 4.3** D12S346 bölgesinin PCR'ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü (**M**:Markır (50-100-150-200-250.....1031 bp), **T**:Tümörlü doku, **N**:Normal doku, **1T**: 1 nolu örneğe ait tümör dokusu, **1N**: 1 nolu örneğe ait normal doku)

D12S78 primer çifti kullanılarak yapılan PCR sonucu 171–201 bç arasında değişen büyüklüklerde ürünler elde edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde 120 V'da 27 dakika süresince yürütülmüş ve örnek jel görüntüsü Şekil 4.4'de verilmiştir.



**Şekil 4.4** D12S78 bölgesinin PCR'ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü (**M**:Markır (50-100-150-200-250.....1031 bp), **T**:Tümörlü doku, **N**:Normal doku, **1T**: 1 nolu örneğe ait tümör dokusu, **1N**: 1 nolu örneğe ait normal doku)

D12S129 primer çifti kullanılarak yapılan PCR sonucu 159–194 bç arasında değişen büyüklüklerde ürünler elde edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde 120 V'da 27 dakika süresince yürütülmüş ve örnek jel görüntüsü Şekil 4.5'de verilmiştir.



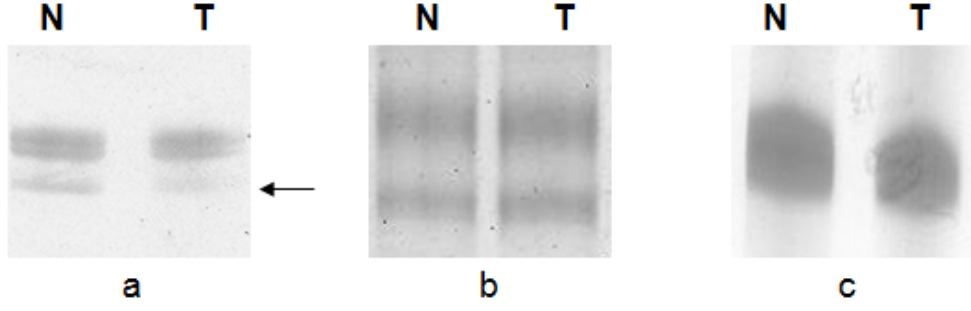
**Şekil 4.5** D12S129 bölgesinin PCR'ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü (**M**:Markır (50-100-150-200-250.....1031 bp), **T**:Tümörlü doku, **N**:Normal doku, **29T**: 29 nolu örneğe ait tümör dokusu, **29N**: 29 nolu örneğe ait normal doku)

### **4.3 Heterozigotluk Kaybıyla (LOH) İlişkili Bulgular**

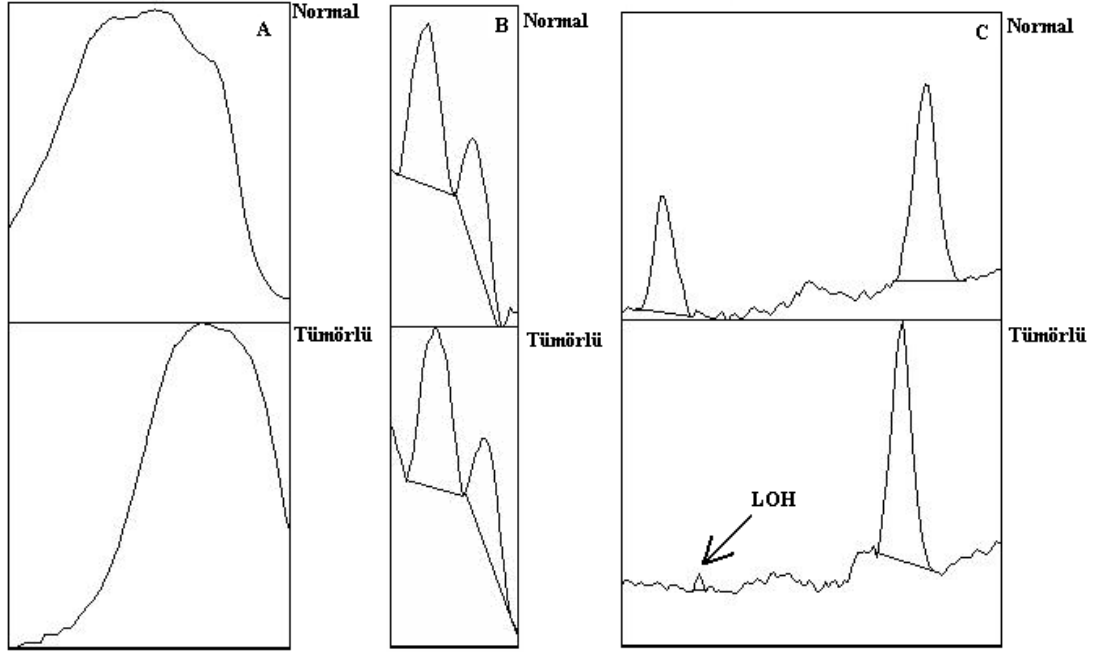
Kolorektal kanserli 47 hastaya ait normal ve tümörlü dokulardan elde edilen DNA örneklerinde D12S83, D12S1660, D12S346, D12S78 ve D12S129 polimorfik markırları kullanılarak kromozom 12q13–24 bölgesindeki heterozigotluk kaybı (LOH) araştırılmıştır. Bu amaçla hastaların tümörlü doku DNA'ları ile normal doku DNA'ları birbirleriyle kıyaslanmıştır.

#### **4.3.1 D12S83 Markır Bulguları**

D12S83, 12. kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan bir dinükleotid tekrar markırıdır. PCR ile çoğaltılan ürünler %8'lik poliakrilamid jelde yürütülerek ayrıştırılmış ve gümüş boyama ile de görüntülenmiştir. Kolorektal kanserli 47 hastanın 38'inde D12S83 bölgesinde heterozigotluk, 5'inde de homozigotluk gözlenmiştir. Bu heterozigotluk gözlenen 38 hastanın 12'sinde (% 31,5) ise LOH tespit edilmiştir. LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir. D12S83 markır bölgesinde homozigot, heterozigot ve LOH gözlenen örneklerin imageJ programında değerlendirilmeleri ile oluşan sonuçlar Şekil 4.7'de görülmektedir.



**Şekil 4.6** D12S83 markır bölgesinde LOH (2 numaralı örnek) (a), heterozigotluk (5 numaralı örnek) (b) ve homozigotluk (19 numaralı örnek) (c) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri (N:Normal doku, T:Tümörlü DNA)



**Şekil 4.7** A. 19 numaralı örnekte D12S83 bölgesinde gözlenen homozigot profili  
 B. 1 numaralı örnekte D12S83 bölgesinde gözlenen heterozigot profili  
 C. 22 numaralı örnekte D12S83 bölgesinde gözlenen LOH profili

D12S83 bölgesinde gözlenen LOH ile yaş, cinsiyet, tümörün patolojik evresi (Tablo 4.2) ve tümörün yerleşim yeri (Tablo 4.3) arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.2** D12S83 markırında gözlenen LOH ile hastaların yaşı, cinsiyeti ve hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki

	LOH (+) (%) n=12	LOH (-) (%) n=35	p	OR <sup>a</sup> (95% GA)
Evre				
<i>Evre II</i>	9 (75)	18(51,4)	0,241	4,308 (0,375-49,528)
<i>Evre III</i>	2 (16,7)	12 (34,3)	0,862	1,268 (0,87-18,546)
<i>Evre IV</i>	1 (8,3)	15 (14,3)	-	1 (Referans)
Yaş (ort±std.s)	61±17,205	60,97±14,96	0,668	0,990 (0,945-1,037)
Cinsiyet				
<i>Kadın</i>	2 (16,7)	13 (37,1)	0,130	0,258 (0,045-1,491)
<i>Erkek</i>	10 (83,3)	22(62,9)	-	1 (Referans)

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok; GA, Güven aralığı; OR, odds oranı; ort, ortalama; std.s, standart sapma. <sup>a</sup> Yaşa ve cinsiyete göre düzeltilmiş

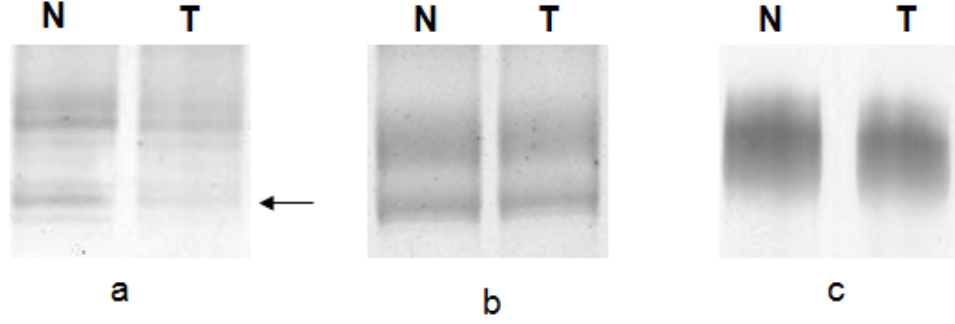
**Tablo 4.3** D12S83 markırında gözlenen LOH ile örneğin alındığı yer arasındaki istatistiksel ilişki

Örneğin Alındığı Yer	D12S83	
	LOH (+) (%)	LOH (-) (%)
Sağ kolon	0 (0)	1 (2,9)
Sol kolon	4 (33,3)	7 (20,0)
Transvers kolon	2 (16,7)	1 (2,9)
Sigmoid kolon	4 (33,3)	14(40,0)
Rektosigmoid	0 (0)	2 (5,7)
Kolon	0 (0)	3 (8,6)
Rektum	2 (16,7)	7 (20,0)
<i>p değeri</i>	0,364	

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok

#### 4.3.2 D12S1660 Markır Bulguları

D12S1660 12. kromozomun uzun kolu üzerinde yer alır. Çalışmaya dahil edilen kolorektal kanserli hastaların 43'ünde bu markırın yerleştiği bölgede heterozigotluk tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 43 hastanın 11'inde (% 25,5) LOH saptanmıştır. D12S1660 bölgesinde LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 4.8'de verilmiştir.



**Şekil 4.8** D12S1660 markır bölgesinde LOH (28 numaralı örnek) (a), heterozigotluk (25 numaralı örnek) (b) ve homozigotluk (31 numaralı örnek) (c) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri (N:Normal doku, T:Tümörlü DNA)

D12S1660 bölgesinde gözlenen LOH ile yaş, cinsiyet, tümörün patolojik evresi (Tablo 4.4) ve tümörün yerleşim yeri (Tablo 4.5) arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.4** D12S1660 markırında gözlenen LOH ile hastaların yaşı, cinsiyeti ve hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki

	LOH (+) (%) n=11	LOH (-) (%) n=36	<i>p</i>	OR <sup>a</sup> (95% GA)
Evre				
<i>Evre II</i>	6 (54,5)	21(58,3)	0,351	0,362 (0,043-3,060)
<i>Evre III</i>	3 (27,3)	11(30,6)	0,382	0,354 (0,034-3,643)
<i>Evre IV</i>	2(18,2)	4(11,1)	-	1(Referans)
Yaş (ort±std.s)	64,27±9,689	59,97±16,708	0,309	1,026 (0,976-1,080)
Cinsiyet				
<i>Kadın</i>	4(36,4)	11(30,6)	0,504	1,688 (0,363-7,847)
<i>Erkek</i>	7(63,6)	25(69,4)	-	1(Referans)

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok; GA, Güven aralığı; OR, odds oranı; ort, ortalama; std.s, standart sapma. <sup>a</sup> Yaşa ve cinsiyete göre düzeltilmiş

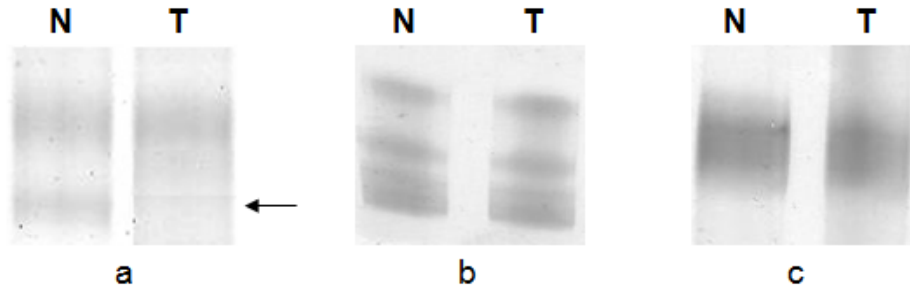
**Tablo 4.5** D12S1660 markırında gözlenen LOH ile örneğin alındığı yer arasındaki istatistiksel ilişki

Örneğin Alındığı Yer	D12S1660	
	LOH (+) (%)	LOH (-) (%)
Sağ kolon	0 (0)	1 (2,8)
Sol kolon	5 (45,3)	6 (16,7)
Transvers kolon	0 (0)	3 (8,3)
Sigmoid kolon	3 (27,3)	15(41,7)
Rektosigmoid	1 (9,1)	1 (2,8)
Kolon	1 (9,1)	2 (5,6)
Rektum	1 (9,1)	8 (22,2)
<i>p değeri</i>	0,330	

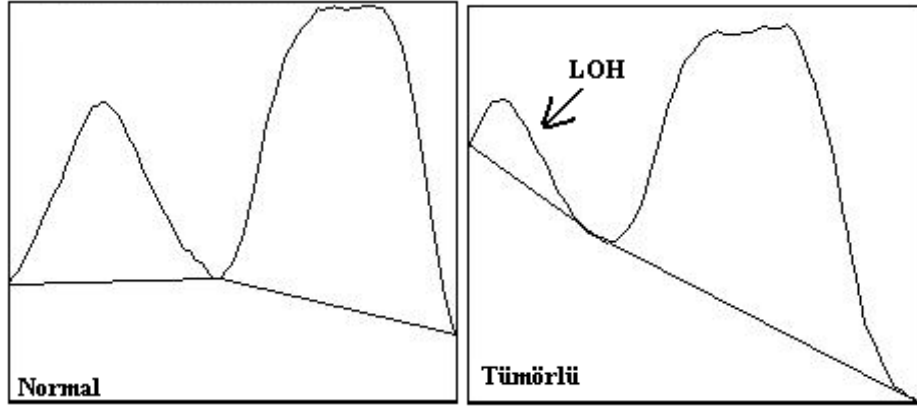
LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok

#### 4.3.3 D12S346 Markır Bulguları

D12S346, 12. kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan bir dinükleotid tekrar markırıdır. PCR ile çoğaltılan ürünler %8'lik poliakrilamid jelde yürütülerek ayrıştırılmış ve gümüş boyama ile de görüntülenmiştir. Kolorektal kanserli 47 hastanın 27'sinde D12S346 bölgesinde heterozigotluk, 19'unda da homozigotluk gözlenmiştir. Bu heterozigotluk gözlenen 27 hastanın 8'inde (%29,6) ise LOH tespit edilmiştir. LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel görüntüleri Şekil 4.9'da, imageJ programında değerlendirilmeleri ile oluşan sonuçları Şekil 4.10'da görülmektedir.



**Şekil 4.9** D12S346 markır bölgesinde LOH (1 numaralı örnek) (a), heterozigotluk (2 numaralı örnek) (b) ve homozigotluk (5 numaralı örnek) (c) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri (N:Normal doku, T:Tümörlü DNA)



**Şekil 4.10** 1 numaralı örnekte D12S346 bölgesinde gözlenen LOH profili

D12S346 bölgesinde gözlenen LOH ile yaş, cinsiyet, tümörün patolojik evresi (Tablo 4.6) ve tümörün yerleşim yeri (Tablo 4.7) arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.6** D12S346 markırında gözlenen LOH ile hastaların yaşı, cinsiyeti ve hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki

	LOH + (%) n=8	LOH - (%) n=39	p	OR <sup>a</sup> (95% GA)
Evre				
<i>Evre II</i>	2(25)	25(64,1)	0,098	0,124 (0,010-1,473)
<i>Evre III</i>	4(50)	10(25,6)	0,699	0,642 (0,068-6,082)
<i>Evre IV</i>	2(25)	4(10,3)	-	1(Referans)
Yaş (ort±std.s)	57,88±14,584	61,62±15,630	0,749	0,992 (0,942-1,044)
Cinsiyet				
<i>Kadın</i>	3(37,5)	12 (30,8)	0,428	2,106 (0,334-13,288)
<i>Erkek</i>	5(62,5)	27 (69,2)	-	1(Referans)

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok; GA, Güven aralığı; OR, odds oranı; ort, ortalama; std.s, standart sapma. <sup>a</sup> Yaşa ve cinsiyete göre düzeltilmiş



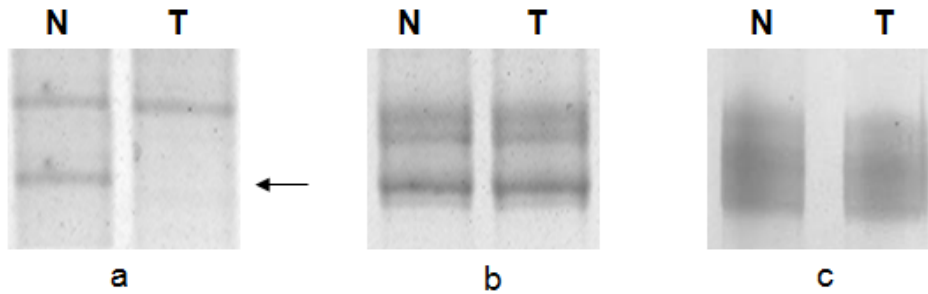
**Tablo 4.7** D12S346 markırında gözlenen LOH ile örneğin alındığı yer arasındaki istatistiksel ilişki

Örneğin Alındığı Yer	D12S346	
	LOH (+) (%)	LOH (-) (%)
Sağ kolon	0 (0)	1 (2,6)
Sol kolon	2 (25,0)	9 (23,1)
Transvers kolon	1 (12,5)	2 (5,1)
Sigmoid kolon	4 (50,0)	14(35,9)
Rektosigmoid	0 (0)	2 (5,1)
Kolon	1 (12,5)	2 (5,1)
Rektum	0 (0)	9 (23,1)
<i>p değeri</i>	0,452	

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok

#### 4.3.4 D12S78 Markır Bulguları

D12S78 12. kromozomun uzun kolu üzerinde bulunur. Çalışmaya dahil edilen 47 kolorektal kanserli hastaların 30'unda D12S78 markırının yerleştiği bölgede heterozigotluk tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 30 hastanın 7'sinde (%23,3) LOH saptanmıştır. D12S78 bölgesinde LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hastalara ilişkin poliakrilamid jel fotoğrafları Şekil 4.11'de verilmiştir.



**Şekil 4.11** D12S78 markır bölgesinde LOH (17 numaralı örnek) (a), heterozigotluk (32 numaralı örnek) (b) ve homozigotluk (35 numaralı örnek) (c) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri (N:Normal doku, T:Tümörlü DNA)

D12S78 bölgesinde gözlenen LOH ile yaş, cinsiyet, tümörün patolojik evresi (Tablo 4.8) ve tümörün yerleşim yeri (Tablo 4.9) arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.8** D12S78 markırında gözlenen LOH ile hastaların yaşı, cinsiyeti ve hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki

	LOH (+) (%) n=12	LOH (-) (%) n=35	<i>p</i>	OR <sup>a</sup> (95% GA)
Evre				
<i>Evre II</i>	5 (71,4)	22 (55,0)	0,548	2,207 (0,166-29,275)
<i>Evre III</i>	1 (14,3)	13 (32,5)	0,757	0,619 (0,030-12,965)
<i>Evre IV</i>	1 (14,3)	5 (12,5)	-	1(Referans)
Yaş (ort±std.s)	58±11,328	61,50±16,030	0,426	0,978 (0,926-1,033)
Cinsiyet				
<i>Kadın</i>	1 (14,3)	14 (35)	0,247	0,255 (0,025-2,576)
<i>Erkek</i>	6 (85,7)	26 (65)	-	1(Referans)

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok; GA, Güven aralığı; OR, odds oranı; ort, ortalama; std.s, standart sapma. <sup>a</sup> Yaşa ve cinsiyete göre düzeltilmiş

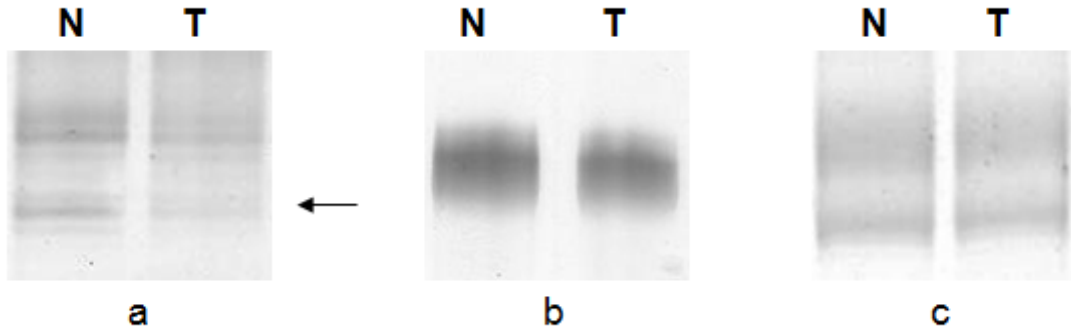
**Tablo 4.9** D12S78 markırında gözlenen LOH ile örneğin alındığı yer arasındaki istatistiksel ilişki

Örneğin Alındığı Yer	D12S78	
	LOH (+) (%)	LOH (-) (%)
Sağ kolon	0 (0)	1 (2,5)
Sol kolon	2 (28,6)	9 (22,5)
Transvers kolon	1 (14,3)	2 (5,0)
Sigmoid kolon	2 (28,6)	16(40,0)
Rektosigmoid	0 (0)	2 (5,0)
Kolon	1 (14,3)	2 (5,0)
Rektum	1 (14,3)	8 (20,0)
<i>p değeri</i>	0,851	

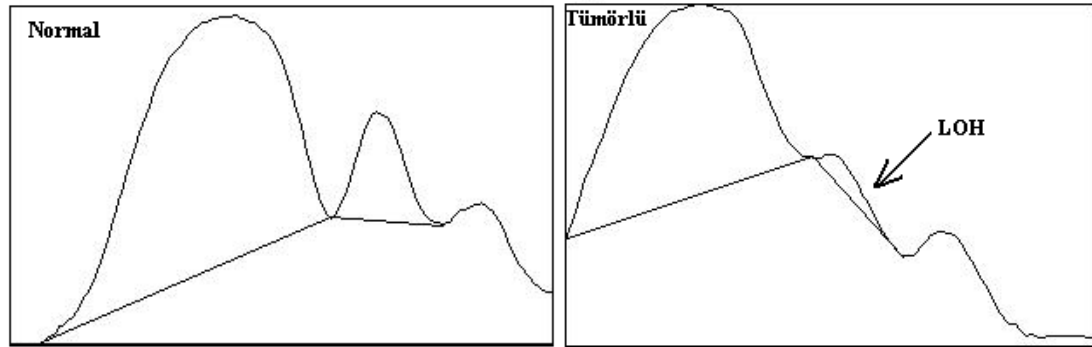
LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok

#### 4.3.5 D12S129 Markır Bulguları

D12S129 12. kromozomun uzun kolu üzerinde bulunan polimorfik bir markırdır. Çalışmaya dahil edilen 47 kolorektal kanserli hastaların 32'sinde D12S129 markırının yerleştiği bölgede heterozigotluk tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 32 hastanın 11'inde (%34,3) LOH saptanmıştır. D12S129 bölgesinde LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel fotoğrafları Şekil 4.12'de, imageJ programında değerlendirilmeleri ile oluşan sonuçları Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.12 D12S129 markır bölgesinde LOH (15 numaralı örnek) (a), heterozigotluk (1 numaralı örnek) (b) ve homozigotluk (11 numaralı örnek) (c) gözlenen hastalara ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri (N:Normal doku, T:Tümörlü DNA)



Şekil 4.13 15 numaralı örnekte D12S129 bölgesinde gözlenen LOH profili

D12S129 bölgesinde gözlenen LOH ile yaş, cinsiyet (Tablo 4.10), tümörün patolojik evresi (Tablo 4.11) ve tümörün yerleşim yeri (Tablo 4.12) arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.10** D12S129 markırında gözlenen LOH ile hastaların yaşı ve cinsiyeti arasındaki istatistiksel ilişki

	<b>LOH (+) (%)</b> <b>n=11</b>	<b>LOH (-) (%)</b> <b>n=36</b>	<b>p</b>	<b>OR<sup>a</sup> (95% GA)</b>
Yaş (ort±std.s)	59,64±17,305	61,39±14,971	0,732	0,992 (0,950-1,036)
Cinsiyet				
<i>Kadın</i>	3 (27,3)	12 (33,3)	0,701	0,746 (0,167-3,337)
<i>Erkek</i>	8 (72,7)	24 (66,7)	-	1(Referans)

LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok; GA, Güven aralığı; OR, odds oranı; ort, ortalama; std.s, standart sapma. <sup>a</sup> Yaşa ve cinsiyete göre düzeltilmiş

**Tablo 4.11** D12S129 markırında gözlenen LOH ile hastalığın patolojik evresi arasındaki istatistiksel ilişki

	<b>LOH (+) (%)</b> <b>n=11</b>	<b>LOH (-) (%)</b> <b>n=36</b>
<i>Evre II</i>	6 (54,5)	21 (58,3)
<i>Evre III</i>	5 (45,5)	9 (25,0)
<i>Evre IV</i>	0 (0)	6 (16,7)
<i>p</i>	0,117	

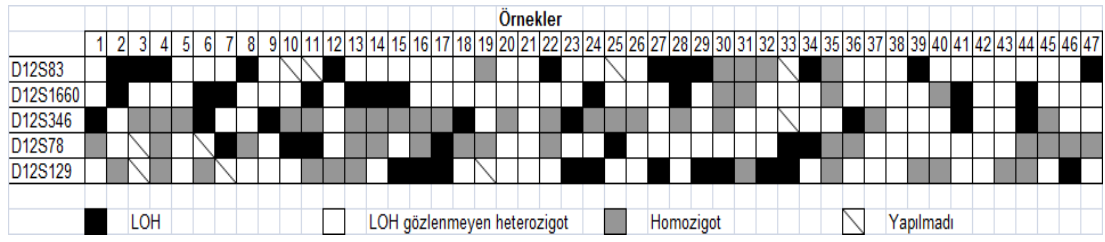
LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok

**Tablo 4.12** D12S129 markırında gözlenen LOH ile örneğin alındığı yer arasındaki istatistiksel ilişki

<b>Örneğin Alındığı Yer</b>	<b>D12S129</b>	
	<b>LOH (+) (%)</b>	<b>LOH (-) (%)</b>
Sağ kolon	1 (9,1)	0 (0)
Sol kolon	2 (18,2)	9 (25,0)
Transvers kolon	2 (18,2)	1 (2,8)
Sigmoid kolon	3 (27,3)	15(41,7)
Rektosigmoid	1 (9,1)	1 (2,8)
Kolon	0 (0)	3 (8,3)
Rektum	2 (18,2)	7 (19,4)
<i>p değeri</i>	0,212	

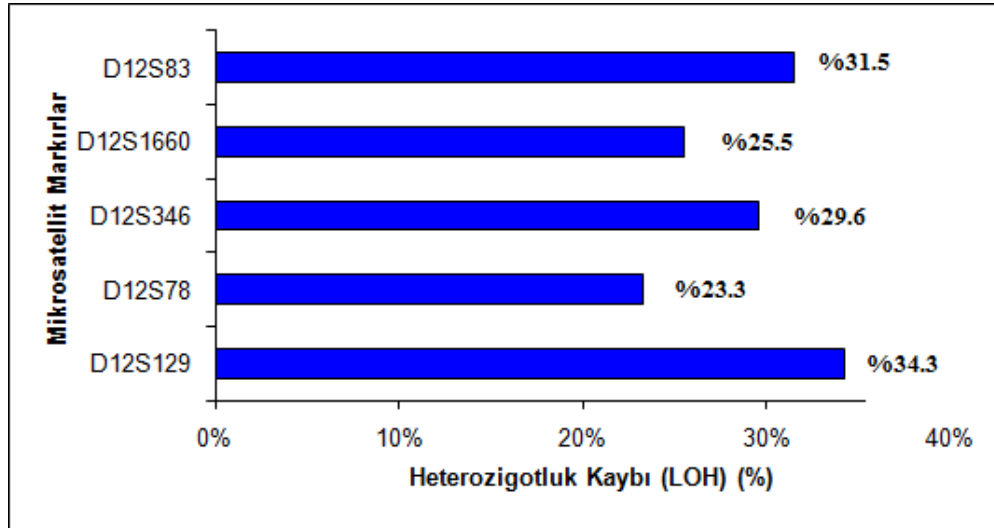
LOH (+), LOH var; LOH (-), LOH yok

Yapılan çalışmalar sonucunda 47 hastanın 34'ünde (%72,3) en az bir bölgede heterozigotluk kaybı saptanmıştır (Şekil 4.14).



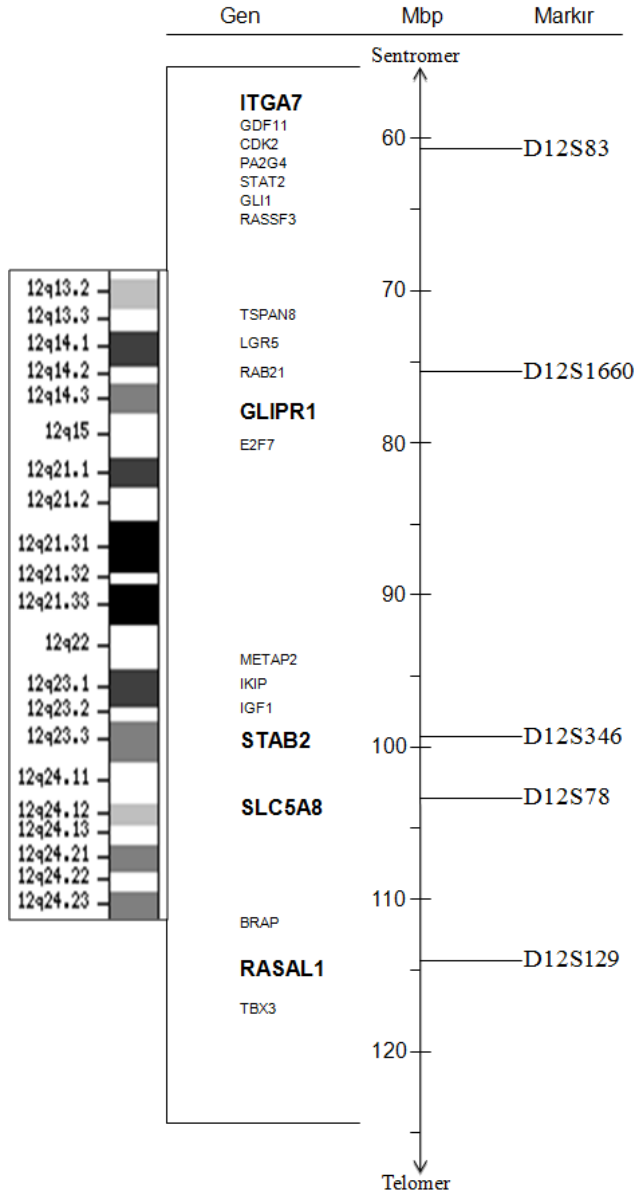
Şekil 4.14 Kolorektal kanserli hastalarda her bir markırda tespit edilen sonuçlar.

En yüksek LOH frekansı % 34,3 ile D12S129 lokusunda, en düşük LOH frekansı ise %23,3 ile D12S78 lokusunda saptanmıştır. D12S83 lokusunda % 31,5, D12S1660 lokusunda % 25,5 ve D12S346 lokusunda da % 29,6 oranında LOH tespit edilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 LOH dağılımının grafiksel olarak gösterimi

Kromozom 12q13-24 bölgesinde bulunan markırların ve genlerin yerlerini gösteren harita National Center for Biotechnology Information (NCBI), ve The Genome Database (GDB) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>, <http://www.gdb.org/>)' den sağlanan bilgilerle oluşturulmuş ve Şekil 4.16'da verilmiştir.



**Şekil 4.16** 12q13-24 kromozom bölgesinde bulunan markırların ve genlerin yerlerini gösteren harita (National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>) ve The Genome Database (GDB) (<http://www.gdb.org/>))

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolorektal kanser dünya genelinde en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden birisidir. Her iki cinsiyette de en sık görülen kanserlerin üçüncü sırasını oluşturmaktadır (Souglakos, 2007). Kanser, çok sayıdaki kromozom ve genlerde meydana gelen genetik değişikliklerin birikmesi sonucunda oluşmaktadır (Çetin vd., 2008; Velasco vd., 2008). Kolorektal kanserlerdeki adenom-karsinom dönüşümü çok basamaklı karsinogenez örnek verilecek modellerin başında yer almaktadır. Genetik değişiklikler arasında tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu kritik basamaklardan birini oluşturmaktadır (Ekmekçi, 2006). Kromozomun belirli bir bölgesindeki allelik kayıp bu bölgede bir tümör baskılayıcı genin varlığını işaret eder. LOH analizi aday tümör baskılayıcı genlerin lokalizasyonunu belirlemede kullanılan etkili bir metottur. (Knudson, 1971; Peng vd., 2003).

Kolorektal kanserlerle ilgili yapılan çalışmalarda 1p, 1q, 4q, 5q, 8p, 9q, 12p, 14q, 15q, 17p, 17q, 18p, 18q ve 22q gibi birçok farklı kromozom bölgesinde değişik oranlarda heterozigotluk kayıplarının olduğu bildirilmiştir (Choi vd., 2002; Popat vd., 2003; Zhou vd., 2004; Kapitanovic vd., 2004; Cacev vd., 2005; Zheng vd., 2005; Chang vd., 2005; Mao vd., 2006; Wan vd., 2006). Özellikle *APC*, *p53* ve *DCC* tümör baskılayıcı genlerinin lokalize olduğu 5q, 17p ve 18q kromozom bölgelerinde sık allelik kayıplar tespit edilmiştir (Peng vd., 2003; Chang vd., 2005). Daha önce yapılan çalışmalarda 12. kromozomun uzun kolunun farklı lokuslarında mide kanserlerinde, pankreas kanserlerinde, erken evre flat-type kolorektal tümörlerde ve adenoid kistik karsinomlarda heterozigotluk kayıpları saptanmıştır (Sano vd., 1991; Rutherford vd., 2005; Orita vd., 2006; Kimura vd., 1996; Kimura vd., 1998; Yatsuoka vd., 2000). Bu çalışmada kolorektal kanserlerde 12q13–24 lokuslarındaki LOH profili ve buna bağlı olarak incelenen bölgedeki aday tümör baskılayıcı genler belirlenmiştir.

Bu çalışmada 47 kolorektal kanserli hastada, 12q bölgesinden seçilen 5 mikrosatellit markır için % 23,3 ile % 34,3 arasında değişen LOH tespit edilmiştir. Farklı kanser

türlerinde 12. kromozomun uzun kolu üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Mide kanserlerinde yapılan araştırmalarda Fey vd. (1989) 12q24-qter lokusunda % 55, Sano vd. (1991) 12q'da % 31 oranında ve Wang vd. (2007) % 33 oranında LOH saptamışlardır. Pankreas kanserlerinde de farklı çalışmalarda kromozom 12q'da % 34 ile % 67.5 oranlarında değişen allelik kayıplar gösterilmiştir (Kimura vd., 1998; Yatsuoko vd., 2000). Adenoid sistik karsinomlarda 12q13.11 bölgesinde % 83, 12q13.13 bölgesinde % 46 ve 12q24.23-33'de ise % 40 LOH bildirilmiştir (Rutherford vd., 2005). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile daha önce 12q üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar birbirleriyle uyumluluk göstermektedir.

Elde edilen bulgularda en yüksek heterozigotluk kaybı (% 34,3) D12S129 markır bölgesinde saptanmıştır. D12S129 markırının yerleştiği kromozom lokusunun yakın bölgelerinde birçok gen bulunmaktadır. Bu genlerden özellikle *RASALI* geni onkogen olarak tanımlanan *RAS* geninin (Bos, 1989) inaktive olmasında rol almaktadır (Ohta vd., 2009). *RASALI* geni, RNAi çalışmaları ile aday tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır (Kolfshoten vd., 2005). Bununla beraber *RASALI*'in  $Ca^{+2}$  aracılıklı regülasyonu bir çok kanser çeşidinde tümör baskılayıcı yolakda önemlidir (Jin vd., 2007). Nazofarinks, meme, akciğer, karaciğer ve özofagus karsinom hücre hatlarında *RASALI* ekspresyonunun önemli derecede düştüğü kaydedilmiştir (Jin vd., 2007). Ayrıca kolorektal kanser hücre hatlarında *RASALI* promotörünün metilasyona uğradığı ve genin ekspresyonunda azalma olduğu Ohta vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada bildirilmiştir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda D12S129 markır bölgesinde yüksek LOH gözlenmesi ve bu bölgeye yakın bulunan *RASALI* geninin, daha önce yapılan çalışmalarla da desteklenmesi sonucu, kolorektal kanserlerde aday tümör baskılayıcı gen olabileceği düşünülmektedir.

El Rifai vd. (2001) karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) metodunu kullanarak yaptıkları çalışmalarında tükrük bezi tümörlerinde 12q12–13 kromozom bölgesinde tanımlanmamış tümör baskılayıcı aktiviteye sahip gen bulunabileceğini bildirmişlerdir. D12S83 (12q13.2) markırının bulunduğu lokusta birçok gen bulunmaktadır. Bu genlerden *ITGA7* geninin bir çok insan malignansilerinde (prostat kanseri, hepatoselüler karsinoma, glioblastoma ve leiomyosarkoma) mutasyona



uğrayıp ekspresyonunda azalma meydana gelmesi ve bu genin tümör baskılayıcı aktivite gösterdiğinin saptanması (Ren vd., 2007) bize *ITGA7* geninin kolorektal kanserlerde de tümör gelişimini baskılayıcı rol alabileceğini göstermektedir.

D12S346 (12q23.1) markırında tümörlü dokularda % 29,6 LOH saptanmıştır. Mide kanserlerinde de aynı markırda LOH sıklığı % 33 bulunmuştur (Wang vd., 2007). Park vd. (2005) pankreas kanserlerinde yaptıkları çalışmalarında 12q21 ve 12q23 lokuslarında allelik kayıplar saptamışlar ve 12q23 lokusunda bulunan *STAB2* geninin aday tümör baskılayıcı gen olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada D12S346 markırının bulunduğu bölgede heterozigotluk kaybının tespit edilmesi *STAB2* geninin kolorektal kanserlerde tümör gelişimini baskılamada görev alabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada D12S1660 (12q21.2) (% 25,5) ve D12S78 (12q23) (% 23,3) markır bölgelerindeki LOH diğer markırlara (D12S129, D12S83 ve D12S346) kıyasla daha düşük oranlarda bulunmuştur. D12S1660 markırına yakın bir bölgede bulunan *GLIPRI* geninin prostat kanserlerinde (Ren vd., 2004), D12S78 markırına yakın bulunan *SLC5A8* geninin de kolon ve mide kanserlerinde (Ganapathy vd., 2005) yapılan çalışmalarla aday tümör baskılayıcı gen olduğunun gösterilmesi bu genlerin kolorektal kanserlerde de aynı aktiviteye sahip olabileceği fikrini oluşturmakta ve bu çalışmadan elde edilen bulguları desteklemektedir. Kimura vd. (1998) pankreatik kanserlerde kromozom 12q21 ve 12q22–23.1 bölgelerinde aday tümör baskılayıcı gen olduğunu rapor etmişlerdir.

Kolorektal kanserlerde kromozom 12q13–24 bölgesinden seçilen her bir markırda saptanan LOH ile klinik-patolojik veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $p>0,05$ ). Diğer araştırmacılar tarafından yapılan çok sayıdaki çalışmalarda da LOH ile klinik-patolojik bulgular arasında anlamlı ilişki saptanmadığına dair literatürler bulunmaktadır (Kimura vd., 1998; Zhou vd., 2004; Cacev vd., 2005; Rutherford vd., 2005).

Kolorektal kanserler çok aşamalı ve uzun bir karsinogenez aşamasından sonra oluşmaktadır. Bundan dolayı 40'lı yaşların üzerinde daha sık görülmektedir. Bu nedenle erken tanıyı hedefleyen yeni stratejilerin belirlenmesi son derece önem taşımaktadır. Kolorektal kanserlerde erken tanı, kanser oluşumunda etkili olan

genlerin belirlenmesi ve bu genlerin kanserin oluşum mekanizmasındaki rollerinin ortaya konması ile mümkün olacaktır. Tümör baskılayıcı genler bu mekanizmada önemli görev üstlenen genler arasında yer almaktadır. Kanserlerde gözlenen heterozigotluk kayıpları hedeflenen kromozom bölgelerinde tümör baskılayıcı genler bulunabileceğine dair güçlü ipuçları vermektedir. Bu tez çalışmasında kolorektal kanserli hastalarda 12q13–24 bölgesinde heterozigotluk kayıpları tespit edilmiştir. Sonuç olarak elde edilen heterozigotluk kayıpları, kromozom 12q13–24 üzerinde kolorektal kanserle ilişkili tümör baskılayıcı olmaya aday genlerin bulunabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu çalışma ile tespit edilen genlerin kesin olarak kolorektal kanser ile olan ilişkilerinin belirlenmesi bundan sonra yapılacak çalışmalar ile ortaya konabilecektir.

## 6. KAYNAKLAR

Akar, N. (1999). *Moleküler Patolojiye Giriş*. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, ANTIP A.Ş. Yayınları.

Akkiprik, M. (2005). *Kolorektal Kanserlerdeki Genetik Değişimleri Klinik Önemi*. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Marmara Üniversitesi, İstanbul.

Akpınar, G. (2006). *Kolon Kanserinde Apolipoprotein E (Apo E) Gen Polimorfizminin Araştırılması*. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli.

American Cancer Society. (2004). Colorectal Cancer Staging. *A Cancer Journal for Clinicians*, **54**, 362–365

Ay, M.E. (2005). *Kolorektal Kanser Gelişiminde, p21, p27, p57 Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör Genleri (CDKI) ile p53 ve p73 Tümör Supressör Geni Ekspresyon Düzeyi Değişimlerinin Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.

Banda, C.L., Kubota, K., Brown, T.M., Kilmarx, P.H., Bhullar, V., Yanpaisarn, S., Chaisilwattana, P., Siriwasin, W. and Black, C.M.(2001). Typing of Chlamydia trachomatis strains from urine samples by amplification and sequencing the major outer membrane protein gene (omp 1). *Sexually Transmitted Infections*, **77(6)**, 419-422.

Bos, J.L. (1989). *ras* oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Research*, **49**, 4682–4689.

Bugra, D. (2003). Kolonun anatomisi. Kolon, Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları. *Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği*, 1–17

Büyükdoğan, M. (2009). Kolorektal Kanserde Genetik ve Etyolojik Faktörler. *Selçuk Üniversitesi Tıp Dergisi*, **25(3)**, 171–180.

- Cacev, T., Radosevic, S., Spaventi, R., Pavelic, K. and Kapitanovic, S. (2005). NF1 gene loss of heterozygosity and expression analysis in sporadic colon cancer. *Gut*, **54**, 1129–1135
- Calvert, P.M., Frucht, H. (2002). The genetics of colorectal cancer. *Annals of Internal Medicine.*, **137(7)**, 603–12
- Chang, S.C., Lin, J.K., Lin, T.C., Liang, W.Y. (2005). Loss of heterozygosity: An independent prognostic factor of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology.* **11(6)**, 778–784
- Choi, S.W., Lee, K. J., Bae, Y.A., Min, K.O., Kwon, M.S., Kim, K.M. and Rhyu, M.G. (2002). Genetic classification of colorectal cancer based on chromosomal loss and microsatellite instability predicts survival. *Clinical Cancer Research*, **8**, 2311–2322
- 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*, **12**, 1586–1590
- Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2006). *Hücre-Moleküler Yaklaşım* (Meral Sakızlı & Neşe Atabey). İzmir Tıp Kitabevi, İzmir.
- Cowell, J.K. (2001). *Molecular Genetics of Cancer: Second Edition*. Oxford, GRB:BIOS Scientific Publishers Ltd. (<http://site.ebrary.com/lib/deulibrary/Doc?id/=50003&page=17>).
- Çakar, E.Ş. (2007). *Genom Metilasyon Profiline Kolorektal Kansere Etyolojisindeki Rolü*. Uzmanlık Tezi, Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas.
- Çetin, E., Cengiz, B., Gunduz, E., Gunduz, M., Nagatsuka, H., Beder, L.B., Fukushima, K., Pehlivan, D., Ozaslan, M., Yamanaka, N., Nishizaki, K., Shimizu, K., Nagai, N. (2008). Deletion mapping of chromosome 4q22-35 and identification of four frequently deleted regions in head and neck cancers. *Neoplasma*, **55 (4)**, 299–304

Demirel, T. (2005). *Kolorektal Kanserli Hastalarda Paraoksanaz (PON 1) Geninin Polimorfizmi ve Enzim Aktivitesinin Araştırılması*. Uzmanlık Tezi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

de Nooij-van Dalen, A.G., van Buuren-van Seggelen, V.H., Lohman, P.H. and Giphart-Gassler, M. (1998). Chromosome loss with concomitant duplication and recombination both contribute most to loss of heterozygosity in vitro. *Genes Chromosomes Cancer*, **21**, 30–38

Durhan, E. (2006). *Kolon Kanseri Tanılı Olgularda PCR-RFLP Metodu ile p53 Gen mutasyonlarının Saptanması*. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.

Ekmekçi, A. (2006). *Gen, Genetik Değişim ve Hastalıklar*. Gazi Kitabevi, Ankara.

El-Rifai, W., Rutherford, S., Knuutila, S., Frierson jr, H.F. and Moskaluk, C.A. (2001). Novel DNA copy number losses in chromosome 12q12-13 in adenoid cystic carcinoma<sup>1</sup>. *Neoplasia*, **3(3)**, 173–178

Eppert, K., Scherer, S.W., Ozçelik, H., Pirone, R., Hoodless, P., Hyeja, K., Tsui, L-C., Bapat, B., Gallinger, S., Andrulis, I.L., Thomsen, G.H., Wrana, J.L., Attisano, L. (1996). MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGF- $\beta$ -regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell*, **86**, 543–552

Erarslan, E. ve Türkay, C. (2007). Kolorektal Kanser Etyolojisi ve Predispozan Faktörler. *Güncel Gastroenteroloji*, **11(1)**, 19–26

Fey, M.F., Hesketh, C., Wainscoat, J.S., Gendler, S. and Thein, S.L. (1989). Clonal allele loss in gastrointestinal cancers. *British Journal of Cancer*, **59**, 750–754

Fogt, F., Brown, C.A., Badizadegan, K., Zimmerman, R.L., Odze, R. (2004). Low prevalence of loss of heterozygosity and SMAD4 mutations in sporadic and familial juvenile polyposis syndrome-associated juvenile polyps. *The American Journal of Gastroenterology*, **99**, 2025–2031

Ganapathy, V., Gopal, E., Miyauchi, S. and Prasad, P.D. (2005). Biological functions of SLC5A8, a candidate tumor suppressor. *Biochemical Society Transactions*, **33(1)**, 237–240

Garcia, J.M., Rodriguez, R., Dominguez, G., Silva, J.M., Provencio, M., Silva, J., Colmenarejo, A., Millan, I., Muñoz, C., Salas, C., Coca, S., España, P. and Bonilla, F. (2003). Prognostic significance of the allelic loss of the BRCA1 gene in colorectal cancer. *Gut*, **52**, 1756–1763

Göral, V. (2003). Kolorektal Polipler ve Polipozis Sendromları. *Güncel Gastroenteroloji*, **7(1)**, 32–40

Görümlü, G. (2005). *Kolorektal Kanserde Primer ve Metastatik Lezyonların EGFR Ekspresyonu Yönünden Araştırılması*. Uzmanlık Tezi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ege Üniversitesi, İzmir.

Hendon, S.E ve Dipalma, J.A. (2005). U.S. practices for colon cancer screening. *Division of Gastroenterology*, **54(4)**, 179–183

<http://rsbweb.nih.gov/ij/>

<http://www.atonet.org.tr/yeni/index.php?p=804&l=1>

Institute of Medicine (Author). (1992). *Advances in Understanding Genetic Changes in Cancer: Impact on Diagnosis and Treatment Decisions in the 1990s*. National Academic Press, Washington DC, USA, (<http://site.ebrary.com/lib/deulibrary/Doc?id=10056726&page=9>).

İğci, Y.Z. (2004). *Gebelikte Serum Arginaz Seviyesi ile Arginaz Gen Çok Yapılılığı Arasındaki İlişkinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep.

İzbul, T., Müderriszade, M. (2003). KKTC’de kolorektal kanserli olguların retrospektif irdelenmesi. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, **2(1)**, 7–10

Jin, H., Wang, X., Ying, J., Wong, A.H.Y., Cui, Y., Srivastava, G., Shen, Z.Y., Li, E.M., Zhang, Q., Jin, J., Kupzig, S., Chan, A.T.C., Cullen, P.J. and Tao, Q. (2007). Epigenetic silencing of a Ca<sup>2+</sup>-regulated Ras GTPase – activator protein RASAL

defines a new mechanism of Ras activation in human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **104(30)**, 12353–12358

Kambara, T., Whitehall, V.L., Spring, K.J., Barker, M.A., Arnold, S., Wynter, C.V., Matsubara, N., Tanaka, N., Young, J.P., Leggett, B.A. and Jass, J.R. (2004). Role of inherited defects of MYH in the development of sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, **40(1)**, 1–9

Kamory, E., Csokay, B. and Hollo, Z. (2004). Rapid detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene IVS8 5T variant by Real-Time PCR. *Clinical Chemistry*, **50**, 137–1839

Kapitanovic, S., Cacev, T., Radosevic, S., Spaventi, S., Spaventi, R.B, Pavelic, K. (2004). APC gene loss of heterozygosity, mutations, E1317Q, and I1307K germ-line variants in sporadic colon cancer in Croatia. *Experimental and Molecular Pathology*, **77**, 193– 200

Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Chan, S.S-Y., Culotti, J.G., Tessier-Lavigne, M. (1996). Deleted in colorectal cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell*, **87**, 175–185

Kimura, M., Abe, T., Sunamura, M., Matsuno, S. and Horii, A. (1996). Detailed deletion mapping on chromosome arm 12q in human pancreatic adenocarcinoma: identification of a 1-cM region of common allelic loss. *Genes, Chromosome & Cancer*, **17**, 88–93

Kimura, M., Furukawa, T., Abe, T., Yatsuoka, T., Youssef, E.M., Yokoyama, T., Ouyang, H., Ohnishi, Y., Sunamura, M., Kobari, M., Matsuno, S. and Horii, A. (1998). Identification of two common regions of allelic loss in chromosome arm 12q in human pancreatic cancer<sup>1</sup>. *Cancer Research*, **58**, 2456–2460

Klug, W.S., Cummings, M.R. (2005). *Genetik Kavramlar* (Cihan Öner). Palme Yayıncılık, Ankara.

Knudson Jr. A.G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **68(4)**, 820– 823

Kolfschoten, I.G.M., Leeuwen, B., Berns, K., Mullenders, J., Beijersbergen, R.L., Bernards, R., Voorhoeve, P.M. and Agami, R. (2005). A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell*, **121**, 849–858

Kopnin, B.P. (2000). Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis. *Biochemistry*, **65(1)**, 2–27

Korkmaz, K.S. (1997). *Sporadik Kolorektal Kanserlerde Mikrosatellit İnstabilite ve Diğer Genomik Değişiklikler Korelasyonu; p53, K-ras Mutasyon Analizleri*. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. (2005). *The gastrointestinal tract. In: Robbins and Cotran Pathological Basis of Disease. (7<sup>th</sup> ed.)*. Philadelphia: Elsevier Saunders Company.

Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L. (2000). *Temel Patoloji (U. Çevikbaş) Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul.

Lee, T.L, Leung, W.K., Lau, J.Y.W., Tong, J.H.M., Ng, E.K.W., Chan, F.K.L., Chung, S.C.S., Sung, J.J.Y, and To, K.F. (2001). Inverse association between cyclooxygenase-2 overexpression and microsatellite instability in gastric cancer. *Cancer Letters*, **168**, 133–140

Macleod, K. (2000). Tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics & Development*, **10**, 81–93

Mao, X., Hamoudi, R.A., Talbot, I.C., Baudis, M. (2006). Allele-specific loss of heterozygosity in multiple colorectal adenomas: toward an integrated molecular cytogenetic map II. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **167**, 1–14

Mayall, F., Barratt, K. and Shanks, J. (2003). The detection of Simian virus 40 in mesotheliomas from New Zealand and England using real time FRET probe PCR protocols. *Journal of Clinical Pathology*, **56**, 72–730

Mentes, B., İrikörücü, O. (2003). *Kolonun anatomisi. Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları*. Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği, 17 – 31



- Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S.H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, **342**, 705–708
- Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S., Hedge, P., Markham, A., Krush, A.J., Petersen, G., Hamilton, S.R., Nilbert, M.C., Levy, D.B., Bryan, T.C., Preisinger, A.C., Smith, K.J., Su, K.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1991). Mutations of Chromosome 5q21 in FAP and Colorectal Cancer Patients. *Science*, **253**, 665–669
- Ohta, M., Seto, M., Ijuchi, H., Miyabayashi, K., Kudo, Y., Mohri, D., Asaoka, Y., Tada, M., Tanaka, Y., Ikenoue, T., Kanai, F., Kawabe, T. and Omata, M. (2009). Decreased expression of the RAS-GTPase activating protein RASAL1 is associated with colorectal tumor progression. *Gastroenterology*, **136**, 206–216
- Orita, H., Sakamoto, N., Ajioka, Y., Terai, T., Hino, O., Sato, N., Shimoda, T., Kamano, T., Tsurumaru, M. and Fuji, H. (2006). Allelic loss analysis of early-stage flat-type colorectal tumors. *Annals of Oncology*, **17**, 43–49
- Park, Y.M., Kwon, J.A., Kelly, L.A., George, R.D., Mackey, J.A., Adachi, H. and Pogue-Geile, K.L. (2005). HGNT-IV-H and FEEL-2/stabilin 2 represent potential candidate pancreatic cancer tumor suppressor genes localized to 12q21-23. *Proceedings of American Association for Cancer Research*, 46.
- Peng, Z., Zhang, F., Zhou, C., Ling, Y., Bai, S., Liu, W., Qui, G., He, L., Wang, L., Wei, D., Lin, E. and Xie, K. (2003). Genome-wide search for loss of heterozygosity in Chinese patients with sporadic colorectal cancer. *International journal of Gastrointestinal Cancer*, **34 (1)**, 39–47
- Popat, S., Stone, J. and Houlston, R.S. (2003). Allelic imbalance in colorectal cancer at the *CRAC1* locus in early-onset colorectal cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **145**, 70–73
- Ponz de Leon, M., Di Gregorio, C. (2001). Pathology of Colorectal Cancer. *Digestive and Liver Disease*, **33**, 372–388

- Pytkänen, L. (2002). *Loss of heterozygosity and tumour suppressor gene alterations in human cancer: studies on FHIT and NF2 genes in lung cancer, malignant mesothelioma and gastrointestinal stromal tumours*. University of Joensuu, PhD Dissertations in Biology, Joensuu.
- Reischl, U., Bretagne, S., Krüger, D., Ernault, P. and Costa, J.M. (2003). Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infectious Diseases*, **3**, 7
- Reiss, M., Santoro, V., de Jonge, R.R., Vellucci, V.F. (1997). Transfer of chromosome 18 into human head and neck squamous carcinoma cells: evidence for tumor suppression by Smad4/DPC4. *Cell Growth Differentiation*, **8**, 407–415
- Ren, C., Li, L., Yang, G., Timme, T.L., Goltsov, A., Ren, C., Ji, X., Addai, J., Luo, H., Ittmann, M.M. and Thompson, T.C. (2004). RTVP-1, a tumor suppressor inactivated by methylation in prostate cancer. *Cancer Research*, **64**, 969–976
- Ren, B., Yu, Y.P., Tseng, G.C., Wu, C., Chen, K., Rao, U.N., Nelson, J., Michalopoulos, G.K. and Luo, J.H. (2007). Analysis of Integrin  $\alpha 7$  mutations in prostate cancer, liver cancer, glioblastoma multiforme, and leiomyosarcoma. *The Journal of the National Cancer Institute*, **99**, 868–880
- Robins, S.L., Kumar, V. (1987). *Basic Pathology*. W.B. Saunders Company, West Washington Square, PA, USA.
- Ross, D.W. (1998). *Introduction to Oncogenes and Molecular Cancer Medicine*. Springer-Verlag, New York.
- Ruivenkamp, C., Hermsen, M., Postma, C., Klous, A., Baak, J., Meijer, G. and Demant, P. (2003). LOH of PTPRJ occurs early in colorectal cancer and is associated with chromosomal loss of 18q12–21. *Oncogene*, **22**, 3472–3474
- Rupnarain, C., Dlamini, Z., Naicker, S., and Bhoola, K. (2004). Colon cancer: genomics and apoptotic events. *Biological Chemistry*, **385**, 449–464

Rutherford, S., Hampton, G.M., Frierson Jr, H.F. and Moskaluk, A. (2005). Mapping of candidate tumor suppressor genes on chromosome 12 in adenoid cystic carcinoma. *Laboratory Investigation*, **85**, 1076–1085

Sambrook, J. and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. (3<sup>rd</sup> ed.). CSHL Press, ISBN 978-0879699577-4.

Sano, T., Tsujino, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Haruma, K., Ito H., Nakamura, Y., Kajiyama, G. and Tahara, E. (1991). Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q, 5q, and 17p in human gastric carcinomas<sup>1</sup>. *Cancer Research*, **51**, 2926–2931

Schutte, M., da Costa, L.T., Hahn, S.A., Moskaluk, C., Hoque, A.T., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Bittner, M., Meltzer, P.S., Trent, J.M. (1995). Identification by representational difference analysis of a homozygous deletion in pancreatic carcinoma that lies within the BRCA2 region. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **92**, 5950–5954

Schutte, M., Hruban, R.H., Hedrick, L., Cho, K.R., Nadasdy, G.M., Weinstein, C.L., Bova, G.S., Isaacs, W.B., Cairns, P., Nawroz, H., Sidransky, D., Casero, R.A., Jr., Meltzer, P.S., Hahn, S.A. and Kern, S.E. (1996). DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Research*, **56**, 2527–2530

Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D. (2001). *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. (8<sup>th</sup> ed.). McGraw-Hill Medical Publishing Division, United States of America.

Sieber, O.M., Lipton, L., Crabtree, M., Heinimann, K., Fidalgo, P., Phillips, R.K., Bisgaard, M.L., Orntoft, T.F., Aaltonen, L.A., Hodgson, S.V., Thomas, H.J. and Tomlinson, I.P., (2003). Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *The New England Journal of Medicine*, **348(9)**, 791–9

Slowik, A., Borratynska, A., Pera, J., Betlej, M., Dziedzic, T., Krzyszkowski, T., Czepko, R., Figlewicz, D.A. and Szczudlik, A. (2004). II genotype of the Angiotensin-Converting Enzyme gene increases the risk for subarachnoid hemorrhage from ruptured aneurysm. *Stroke*, **35**, 1594–1597

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **99**, 9433–9438

Souglakos, J. (2007). Genetic Alterations in Sporadic and Hereditary Colorectal Cancer: Implementations for Screening and Follow-Up. *Digestive Diseases*, **25**, 9–19

Sönmez, Ö. (2004). *Kolorektal Kanser Gelişim Riski İle p53 Gen Polimorfizmi Arasındaki İlişkinin Önemi*, Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Marmara Üniversitesi, İstanbul.

Tanaka, T., Watanabe, T., Kazama, Y., Tanaka, J., Kanazawa, T., Kazama, S. and Nagawa (2008). Loss of Smad4 Protein Expression and 18qLOH as Molecular Markers Indicating Lymph Node Metastasis in Colorectal Cancer-A Study Matched for Tumor Depth and Pathology. *Journal of Surgical Oncology*, **97**, 69–73

Thiagalingam, S., Foy, R.L., Cheng, K.H., Lee, H.J., Thiagalingam, A. and Ponte, J.F. (2002). Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence. *Current Opinion in Oncology*, **14**, 65–72

Thiagalingam, S., Lengauer, C., Leach, F.S., Schutte, M., Hahn, S.A., Overhauser, J., Willson, J.K., Markowitz, S., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1996). Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nature Genetics*, **13**, 343–6

Thomas, K. (2005). *Molecular pathology and morphogenesis of colorectal cancer*. Türk Patoloji Derneği Mezuniyet Sonrası Eğitim Toplantısı Gastrointestinal Sistem Patolojisi Günleri, İstanbul, pp 38–46.

Tucker, T. (2002). Pathogenesis of hereditary tumors: beyond the "two-hit" hypothesis. *Clinical Genetics*, **62(5)**, 345–357.

Varella-Garcia, M., Gemmill, R.M., Rabenhorst, S.H., Lotto, A., Drabkin, H.A., Archer, P.A. and Franklin, W.A. (1998). Chromosomal duplication accompanies allelic loss in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Research*, **58**, 4701–4707

- Velasco, A., Pallares, J., Santacana, M., Yeramian, A., Dolcet, X., Eritja, N., Puente, S., Sorolla, A., Llecha, N. and Matias-Guiu, X. (2008). Loss of Heterozygosity in Endometrial Carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology*, **27(3)**, 305–317
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Kern, S.E., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Nakamura, Y., White, R. (1989). Allelotype profiles of local recurrences and distant metastases from colorectal-cancer patients. *Science*, **244**, 207–211
- Vogelstein, B. and Gillespie D. (1979). Preparative and analytical of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **76**, 615–619
- Wan, J., Li, H., Li, Y., Zhu, M.L. and Zhao, P. (2006). Loss of heterozygosity of Kras 2 gene on 12p12-13 in Chinese colon carcinoma patients. *World Journal of Gastroenterology*, **12(7)**, 1033–1037
- Wang, H.L., Bai, H., Li, Y., Sun, J., Wang, X.Q. (2007). Rationales for expression and altered expression of apoptotic protease activating factor-1 gene in gastric cancer, *World Journal of Gastroenterology*, **13(38)**, 5060–5064
- Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Gale, P.R. and Büchler, M.W.(2005). Colorectal Cancer. *Lancet*, **365**,153–65
- Wilson, R.H., Whiteside, M.C., Russell, S.E. (1997). Molecular genetics of colorectal cancer (part 1). *Clinical Oncology*, **9**, 14–19
- Yakut, S. (2007). *Glial Tümörlerde ARHI Tümör Süpresör Geninde LOH ve Metilasyon Profillerinin Araştırılması*, Doktora tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- Yatsuoka, T., Sunamura, M., Furukawa, T., Fukushige, S., Yokoyama, T., Inoue, H., Shibuya, K., Takeda, K., Matsuno, S. and Horii, A. (2000). Association of poor prognosis with loss of 12q, 17p, and 18q, and concordant loss of 6q/17p and 12q/18q in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *The American Journal of Gastroenterology*, **95**, 2080–2085

Zauber, N.P., Wang, C., Lee, P.S., Redondo, T.C., Bishop, D.T., Goel, A. (2004). K-ras gene mutations, LOH of the APC and DCC genes, and microsatellite instability in primary colorectal carcinoma are not associated with micrometastases in pericolic lymph nodes or with patients' survival. *Journal of Clinical Pathology*, **57**, 938–942

Zheng, H.T., Jiang, L.X., Lv, Z.C., Li, D.P., Zhou, C.Z., Gao, J.J., He, L. and Peng, Z.H. (2008). Are there tumor suppressor genes on chromosome 4p in sporadic colorectal carcinoma? *World Journal of Gastroenterology*, **14(1)**, 90–94

Zheng, H.T., Peng, Z.H., Zhou, C.Z., Li, D.P., Wang, Z.W., Qiu G.Q. and He, L. (2005). Detailed deletion mapping of loss of heterozygosity on 22q13 in sporadic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, **11(11)**, 1668–1672

Zhou, C.Z., Qiu, G.Q., Fan, J.W., Wang, X.L., Tang, H.M., Huang, L., Sun, Y.H., Peng, Z.H. (2008). Refined mapping of loss of heterozygosity on 1q31.1-32.1 in sporadic colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, **14(10)**, 1582–1587

Zhou, C.Z., Qiu, G.Q., Zhang, F., He, L., Peng, Z.H. (2004). Loss of heterozygosity on chromosome 1 in sporadic colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, **10(10)**, 1431–1435

## 7. ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Ad, Soyad : Türkan AYTEKİN  
Uyruğu : TC  
Doğum tarihi ve yeri : 02 Aralık 1979, Gaziantep  
Medeni hali : Bekar  
Telefon : +90 532 505 13 92  
E-mail : taytekin@gantep.edu.tr

### EĞİTİM

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü	2003
Lisans	Selçuk Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2000
Orta öğrenim	Gaziantep 19 Mayıs Lisesi	1996

### İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Yer	Görev
2004-	Gaziantep Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

### YABANCI DİL

İngilizce

### YAYINLAR

1. Özasan, M. and Aytekin, T. (2009). Loss of heterozygosity in colorectal cancer. *African Journal of Biotechnology*, **8 (25)**, 7308–7312

2. Guldur, M.E., Ozaslan, M., Aytekin, T., Kilic, I.H. and Afacan, I.D. (2006). Toxicity Effect of Zinc Supplementation on the Liver Tissue. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **9(6)**,1139-1142
3. Özaslan, M., Kılıç, İ.H., Aytekin, T., Güldür, M.E., Bozkurt, A.İ. (2005). Investigation of antioxidant effect of zinc biochemically and histopathologically in rats. *Biotechnology&Biotechnological Equipment*, **19(2)**, 136–143
4. Özaslan, M., Barsgan, A., Can, C., Bas, B., Aytekin, T., and Kilic, İ.H. (2005). Prevalence of HBV-DNA among HBsAg positive patients in Southeastern region of Turkey by PCR. *Biotechnology&Biotechnological Equipment*, **19(3)**, 124–127
5. Özaslan,M., Aytekin,T., Kilic,İ.H., Bozkurt,A.H., Güldür,E.,Cengiz,B., Bağcı,C. (2004).The Effect Of Vitamin C Supplementation On Leucocyte Counts And Exercise Performance. *Journal of Exercise Physiology (ASEP)*, **7(2)**, 101–105