

757806

T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRK POPULASYONUNDA ADENOMATOUS POLYPOSİS COLİ  
(APC) GENİNDE 3920 T>A (I 1307 K) NOKTA MUTASYONU  
SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan  
Hatice KARACA**

**Tezi Yöneten  
Prof.Dr.Munis DÜNDAR**

**Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2004  
KAYSERİ**

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

**TÜRK POPULASYONUNDA ADENOMATOUS POLYPOSİS COLİ  
(APC) GENİNDE 3920 T>A (I 1307 K) NOKTA MUTASYONU  
SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan  
Hatice KARACA**

**Tezi Yöneten  
Prof. Dr. Munis DÜNDAR**

**Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2004  
KAYSERİ**

Bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

10 / 02 / 2004

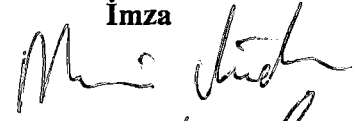
**JÜRİ :**

**Üye** : Prof. Dr. Munis DÜNDAR

**Üye** : Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

**Üye** : Doç.Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

**İmza**



**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 04.03.2004 tarih ve 30.L sayılı kararı ile onaylanmıştır.



**Enstitü Müdürü**

**Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU**



**TEŞEKKÜR**

Bu tezin hazırlanmasında bana her türlü destek veren ve çalışmalarımı yönlendiren çok kıymetli hocam sayın Prof.Dr. Munis DÜNDAR'a Genetik ünitesine ilk geldiğim günden beri hiçbir konuda yardımını esirgemeyen, sayın hocam Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a, tercümelerim sırasında elinden gelen yardımı gösteren yüksek lisans öğrencisi sevgili arkadaşım Recep ERÖZ'e ve her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Filiz KASAP'a, her türlü desteği veren canım aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

**TÜRK POPULASYONUNDA ADENOMATOUS POLYPOSİS COLİ (APC)  
GENİNDE 3920 T>A (I1307K) NOKTA MUTASYONU  
SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**ÖZET**

Çalışmada adenomatous poliposis coli (APC) geninin 3920 T>A (I1307K) nokta mutasyonu sıklığının araştırılması için kolon ve mide karsinomalı 113 hasta ve kontrol amaçlı 36 kişi taranmıştır. APC geni I1307K nokta mutasyonu üzerinde yapılan çalışmalarda genellikle Ashkenazi ırkı kullanılmış ve bu ırkı mutasyonu taşıma oranı yaklaşık % 6 bulunmuştur. Bizim amacımız ise genin kolon ve mide karsinomlarındaki taşıyıcılık sıklığını bulmaktır.

Çalışmamızda hastalardan kan ve doku, kontrol grubundan ise sadece kan örnekleri alındı. DNA izolasyonu yapıldı. Hastalardan alınan doku örnekleri, kolon bölgesinde yer alan polip adı verilen oluşumların çıkartılması ile elde edildi. Doku örneklerinden de DNA izolasyonu yapıldı. DNA'lar elde edildikten sonra aynı yoldan çalışmalara devam edildi.

Beşinci kromozomun 5q21-5q22 bölgesinde oturan ve otozomal dominant kalıtım gösteren bir tümör supressör geni olan APC gen bölgesinin 3920 pozisyonundaki 290 baz çiftlik (bp) kısmı çoğaltmak için PCR işlemi yapıldı. Bu PCR ürünü daha sonra çeşitli solüsyonlarla inkübasyona tabi tutuldu. Inkübasyon sonrası oluşan yeni ürün plakelere aktarılarak antijen-antikor ilişkisine dayanan bir metodla, substratla etkileştirilerek spektrofotometrede 620 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı.

Ölçümlerde bir kuyucuk optik dansisite değeri 0.5'den fazla ise pozitif, 0.35 yada daha az ise negatif kabul edildi.

Çalışmada kullanılan 57 mide karsinomlu hasta grubunun 7 tanesinde 3920 T>A (I1307K) heterezigot sonuç bulundu. Bu grubun 18 kontrol ile istatistiksel karşılaştırılmasında, hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark olmadığı bulundu ( $p>0.05$ ). 56 kolon karsinomlu hastanın 30'unda 3920 T>A (I1307K) heterezigot sonuç bulundu ve 18 kontrol ile karşılaştırdı. Kolon karsinomlu hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ( $p<0.05$ ). Heterezigot (taşıyıcılık) bulunmayan hastalarda karsinom varlığı, kalıtım dışı faktörlerden olabildiğini düşündürdü.

**Anahtar kelimeler:** APC, mide kanseri, kolorektal kanser, I1307K

## SCREENING OF THE 3920 T>A (I1307K) POINT MUTATION ON ADENOMATOUS POLIPOSIS COLI (APC) IN TURKISH POPULATION

### ABSTRACT

In this study, 113 patients who have colon and stomach carcinoma and 36 controls were screened for researching of APC genes 3920 T>A (I1307K) point mutation frequency. In APC gene I1307K point mutation studies, usually Ashkenazi Jewish had been used and the mutation frequency had been found about 6 %. Our aim has found carrier frequency of the gene in colon and stomach carcinomas.

In our study, only blood samples were taken from control group but both of blood and tissue samples were taken from patients. The tissue samples taken from patients were obtained from polyps in colon area. DNA isolation was carried out from tissue samples. After DNA isolation, the studies were continued from same way. To amplify 290 bp apart where 3920 position of APC gene which is a tumor suppressor gene, PCR was carried out. This gene takes part on 5q21-22 area of chromosome five and shows autosomal dominant hereditary. Then this PCR product was incubated with several solutions. The new product which occurred after incubation was transferred for antigen-antibody interaction in plate and was interacted with substrate and measured with 620 nm in spectrophotometer.

In the measurement a well was accepted "positive" if its O.D. is 0.5 or higher or "negative" if its O.D. is 0.35 or lower.

The 3920 T>A (I1307K) heterozygote was found in 7 of 57 stomach carcinoma patients and contrasted with 18 control group. According to this situation, there weren't differences as a statistically between patients and control group ( $p > 0.05$ ). The 3920 T>A (I1307K) heterozygote was found 30 of 56 colon carcinoma and contrasted with 18 control group. There were differences as a statistically between colon carcinoma patients and control group ( $p < 0.05$ ). It was thought that occurrence of the carcinoma could be caused with non-hereditary factors in the patients who hadn't heterozygote.

**Key words:** APC, stomach cancer, colorectal cancer, I1307K

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK.....	I
KABUL ONAY SAYFASI.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
KISALTMALAR.....	VIII
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. MİDE KANSERLERİNİN GENETİĞİ.....	2
2.2. KOLON KANSERLERİ.....	6
2.3. KOLON KANSERLERİNİN GENETİĞİ.....	6
2.3.1. P53 Geni.....	8
2.3.2. K-RAS Geni.....	8
2.3.3. Kolorektal Karsinogenezisinin Oluşum Basamakları.....	9
2.3.4. Ailesel Kolorektal Kanseler.....	10
2.3.5. Kalıtsal Polip Oluşturmayan Kolorektal Kanseler.....	12
2.4. KOLON POLİPLERİ.....	13
2.4.1. Kolon Poliplerinin Etiyolojisi.....	14
2.4.2. Kolon Poliplerinin Patolojisi.....	15
2.5. KANSER VE GENETİK.....	15
2.5.1. Tümör Süpressör Genler.....	16
2.5.2. Onkogenler.....	16
2.6. ADENOMATOUS POLİPOSİS COLİ (APC) GENİ.....	17
2.6.1. APC Genindeki Germline Mutasyonlar.....	18
2.6.2. APC Genindeki Somatik Mutasyonlar.....	18
2.6.3. APC Geni Promotor Metilasyonu.....	19
2.6.4. APC Geni ve $\beta$ kateninin WNT sinyalindeki Rollerini.....	19
2.6.5. Çekirdekdeki APC Geninin Fonksiyonel Rolü.....	20
2.6.6. APC Geni ve Apoptosis.....	21
2.6.7. APC Geni I1307K Mutasyonu.....	21

	<u>Sayfa No</u>
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. ÖRNEKLERİN ALINMASI.....	25
3.2. DNA ELDESİ.....	25
3.2.1. Periferel Kandan DNA Eldesi.....	25
3.2.2. Dokudan DNA Eldesi.....	26
3.3. I. PCR BASAMAĞI.....	27
3.4. PCR'DA İNKÜBASYON BASAMAĞI.....	27
3.5.II. PCR BASAMAĞI.....	28
3.6. ELISA ÇALIŞMA BASAMAĞI.....	28
3.7. SONUÇLARIN ANALİZ EDİLMESİ.....	29
3.8. ÇALIŞMA SÜRESİNCE KULLANILAN SOLÜSYONLARIN HAZIRLANIŞI.....	29
3.8.1. Red Cell Lizis Solüsyonu.....	29
3.8.2. Cell Lizis Solüsyonu .....	29
3.8.3. Protein Pressipitasyon Solüsyonu.....	29
3.8.4. TE Tamponu.....	29
3.8.5. Nüklei Lizis Solüsyonu.....	30
3.8.6. 10 X TBE Solüsyonu.....	30
3.8.7. % 1'lik Etidyum Bromid.....	30
3.8.8. 1 X Yıkama Solüsyonu.....	30
3.8.9. % 2'lik Agaroze Jel Hazırlanması.....	30
4.BULGULAR.....	31
4.1. I.PCR BULGULARI.....	31
4.2. İNKÜBASYON SONRASI BULGULARI.....	32
4.3. II.PCR BULGULARI.....	33
4.4. KOLORİMETRİK DEĞERLENDİRME BULGULARI.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	37
6. KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ.....	56



**KISALTMALAR**

a.a	: Amino asit
AJ	: Ashkenazi jewish
APC	: Adenomatous poliposis coli
CRC	: Kolorektal cancer
CTNNB1	: $\beta$ -Katenin kodlayan gen
ECM	: Extra Cellülar Matrix
EDTA	: Etilen Dodesil Sülfat
FAP	: Ailesel poliposis koli (Familial Polyposis Coli)
GSK3 $\beta$	: Glikojen Sentetaz Kinaz 3 $\beta$
HNPCC	: Kalıtsal polip oluşturmayan kolorektal kanser
I	: Lizin
K	: İzolösin
kD	: Kilo Dalton
LEF	: Lymphoard enhancer factor
LOH	: Heterozigotluğun Kaybı (LossOf Heterozygosity)
MCR	: Mutasyona Duyarlı Bölge (Mutation Cluster Region)
NES	: Nüclear Export Signals
NLS	: Nüclear Localization Signal
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyumdodesil sülfat
TAD	: Transkripsiyonel aktivasyon domain
TCF	: T Cell Factor

## TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
<b>Tablo 2.1.</b> Mide karsinogenezis ve metastasta rol oynayan genlerin tablosu.....	4
<b>Tablo 2.2.</b> Kolon kanser gelişiminde etkili olan genler.....	7
<b>Tablo 4.1.</b> Genotip belirlemek için kriterler.....	34
<b>Tablo 4.2.</b> Şekil 4.3'te görülen Tespit Plate'nin 620 nm'de spektrofotometrede ölçüm değerleri.....	34
<b>Tablo 4.3.</b> Mide CA hastaları ve kontrol grubu karşılaştırılması.....	35
<b>Tablo 4.4.</b> Kolon CA hastaları ve kontrol grubu karşılaştırılması.....	35
<b>Tablo 4.5.</b> Kadın kolon CA hastaları ve kontrol grubu karşılaştırılması.....	36
<b>Tablo 4.6.</b> Erkek kolon CA hastaları ve kontrol grubu karşılaştırılması.....	36
<b>Şekil 2.1.</b> Kolon karsinogenezisin inserininin oluşum basamakları.....	9
<b>Şekil 2.2.</b> APC geni şeması.....	18
<b>Şekil 4.1.</b> Birinci PCR işlemi sonrası jel görüntüsü.....	32
<b>Şekil 4.2.</b> Tespit Plate'nin yandan görünüşü.....	33
<b>Şekil 4.3.</b> Substratla etkileşmiş Tespit Plate'nin üstten görünüşü.....	33

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adenomatous Poliposis Coli (APC) geni 5. kromozom üzerinde q21-22 bölgesinde lokalizedir. APC geni bir tümör supressör genidir. APC geni üzerinde çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır. Bunlardan biride 3920. nükleotidinde Timin (T)'den Adenin (A)'e bir missense mutasyondur. Bu missense mutasyon protein fonksiyonuna etki göstermeyen ve I1307K noktasında izolösin amino asidinin (a.a) lizin a.a.'e substitisyonuna neden olur. Ashkenazi yahudileri (Ashkenazi Jewish; AJ) ırklarının %6'sında söz konusu mutasyon tespit edilmiştir. I1307K nokta mutasyonu mide ve kolon karsinogenezisinin başlangıç aşamasında polip doku oluşumunda etkilidir (1).

APC'deki inaktive edici mutasyonlar ailesel adenomatöz polipozis ile ilişkilidir. APC genindeki germline mutasyonlar nadir olmasına rağmen, gendeki somatik mutasyonlar sporadik kolorektal kanserin %70'inden fazlasında vardır (2).

Çalışmamızda kolon karsinomalı ve mide karsinomalı hastalarda APC 3920 T>A (I1307K) nokta mutasyonu sıklığı taramak ve mutasyon tespit edilen hastalara genetik danışma verilerek hastalığın seyri konusunda bilgilendirmek hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. MİDE KANSERLERİNİN GENETİĞİ

Mide kanseri, kansere bağılı ölümlerde en sık nedenlerden birisidir. Mide kanserlerinin bir kısmı kalıtsal çoğunluğu ise sporadiktir. Moleküler epidemiyolojik çalışmalar kanser gelişimi, ilerlemesi ve metastazını oluşturan sebeplerin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdir. Mide kanserinde kalıtımın rolünü ortaya çıkarmak için yapılan çalışmalar; aile pedigri raporları, ikiz çalışmaları, aile agregasyon çalışmaları ve kan tiplene çalışmalarından oluşur (3).

Nomura ve arkadaşları mide kanseri iki üç kuşak nesillerde mevcut olan bireyler ve ailesinde mide kanseri olan bireylerin, olmayanlara göre iki ila üç kat daha fazla mide kanser riski taşıdıklarını göstermiştir (3).

Lauren'in histolojik olarak sınıflamasına göre, intestinal ve diffüz olmak üzere iki major mide adenokarsinomu vardır (4). Adenokarsinomlarda patogenez ve genetik değişiklikler farklıdır (5-7). En sık mide malignansı intestinal tipte görülür ve genellikle bir seri prekanseröz değişikliklerin art arda gelişimi ile meydana gelir. Bu değişiklikler sonucunda adenom veya displazi ortaya çıkar. Diffüz tip mide karsinomu ise "de novo" olarak ortaya çıkma eğilimindedir. Genellikle displazi ve adenoma ile ilişkili değildir (8,9).

Geniş populasyon çalışmalarında A kan grubuna sahip kişilerde ve özellikle erkeklerde mide kanseri sıklığı daha fazladır. Bu kişilerde intestinal tip mide kanserine oranla diffüz tip mide kanseri daha sık görülür (10).

İntestinal ve diffüz tip mide kanserinin ortak özellikleri; C-met geninin anormal ekspresyonu, P53 tümör supressör geninin inaktivasyonu, CD44 geninin anormal transkripsiyonu ve telomeraz kaybıdır (11,12). E-cadherin duplikasyonunun ve K-sam geni amplifikasyonunun azalması veya yokluğu ise sadece diffüz tip ile ilişkilidir. K-Ras mutasyonu, C-erbB-2 gen amplifikasyonu, APC geninin mutasyonu, BCLII geni ve DCC lokusunun allelik kaybı ve mikrosatellit stabilitesi (mikrosatellit instabilite; MSI) ise daha çok intestinal tip ile ilişkilidir (6,7,11).

Bütün mide displastik lezyonlarının mide karsinomları için prekürsör olmadığına dair iki farklı bulgu vardır. Bunlardan birincisi; klinik olarak mide displazileri özellikle düşük dereceli displastik lezyonlar kendiliğinden gerileyebilir (13,14). Adenom/displazilerin yalnızca %11-40'ı kadarı karsinomaya ilerler (15,16). İkinci olarak; mide adenomalarında APC mutasyonu, mide adenokarsinomlarından daha sık olarak bildirilmiştir. Bununla birlikte, adenokarsinomayla ilişkili mide adenomal displazi lezyonları APC mutasyon sıklığı yönünden derinlemesine incelenmiştir. Daha önceden mevcut olan adenom/displazilerden ortaya çıkan adenokarsinomaların patogenezi APC geninin nasıl bir rol oynadığı çok açık değildir (17,18).

Moleküler genetik çalışmalarında, karsinogenezi genetik değişikliklerin olduğu gösterilmiştir (Tablo 2.1). Mide kanserinde gözlenen en yaygın genetik değişiklikler onkogenlerdeki değişimler, tümör supressör geni inaktivasyonu, heterozigotluk kaybı (Loss of heterozygosity; LOH) ve kısmen basit tekrarlayan sekanslarda DNA replikasyon hatalarıdır. Mide kanserinde c-ki-ras, c-erbB-2, K-sam, Hst/int-2, c-met ve c-myc onkogenlerinde mutasyonlar ve/veya amplifikasyon overekspresyonlar, tümör supressör genleri olarak bilinen P53, APC, DCC (deleted in coloroctal carcinomas) ve RB1 (retinoblastoma)'lerinde inaktivasyonu, DNA tamir genlerinde mutasyonlar (mismatch repair genes; MMR), hücre siklusu regülatör genleri (E-cadherin; CDH), doku invazyonu ile ilişkili genler (CD44) ve kromozom 1q, 5q, 7q, 12q, 13q, 17p, 18q ve Y'yi içine alan bir veya daha fazla LOH'un rol oynadığına inanılmaktadır (8,19,20).

**Tablo 2.1.**Mide karsinogenezis ve metastasta rol oynayan genlerin tablosu

Genler	Nükleotidler (kb)	Kromozomal lokus	Ağırlığı (kDa)	Genetik farklılaşma
<b>Onkogenler</b>				
K –ras	50	12q12.1	Nda <sup>o</sup> /21	Mutasyon
erbB-2	Nda	17q21 – q22	138/gp185	Amplifikasyon
hst-1	11	11q13.3	22/22	Amplifikasyon
int-2	10	7q31	27/27.5 – 31.5	Amplifikasyon
met	Nda	8q24	155.5/gp190	Amplifikasyon
myc	6 -7		49/64 – 67	Amplifikasyon
<b>Tümör süpressör genler</b>				
p53	12.5	17q13.1	43.5/53	LOH,Mutasyon
APC	120	5q21	312/~300	LOH,Mutasyon
DCC	1400	18q21	153/gp175 – 200	LOH
RB1	180	13q14.2	106/105	Mutasyon
E -cadherin	100	16q22.1	97.5/120	Mutasyon
<b>Heterezigot kaybı olan kromozomlar</b>				
		1p, 5q, 7q, 12q, 13q, 17p, 18q, Y		

Kb,:kilobaz, kDa: kilodalton, gp: gikoprotein

Wu ve arkadaşları P53'ün over ekspresyonunun erken tipte mide kanserine göre erken tipte barsak kanserinde daha sık olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca mide kanserinin diffüz tipinde tümör gelişiminde eksprese olduğunu fakat intestinal tipinde eksprese olmadığını göstermişlerdir (21).

Mide kanserinin, kalıtsal nonpoliposis kolorektal kanseri (Hereditary non-polyposis colorctal cancer; HNPCC) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Mide kanserinde, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon analizleri sonucunda DNA'nın kopya sayısında bir çok amplifikasyon ve kayıplar tespit etmiştir. Heterozigotluk kaybı çalışmaları ile

mide tümör gelişiminde, etkili olan tümör supressör genine ait bir çok önemli allelik kayıp bölgeleri gösterilmiştir. Mirosatellit instabilitesi ve ilişkili olan TGF- $\beta$ 1, IGFR1I, BAX, E2F-4, hMSH3 ve hMSH6 genlerindeki değişiklikler mide kanseri çeşitlerinde bulunmuştur. CDH1'i de kapsayan hücre adezyon molekülü anormallikleri diffüz tip mide kanseri gelişiminde önemli rol oynuyor olabilir (21).

C-met geninde farklı ekspresyon ve amplifikasyon , P53 geninin inaktivasyonu ve CD44 anormal transkriptleri mide kanserlerinde yaygın olaylardır (22).

Guilford ve arkadaşları diffüz tip mide kanseri otozomal dominant kalıtım gösteren üç Maori ailesinde ve 16p22.1 kromozomu üzerinde yer alan CDH1 geninde germline mutasyonu tespit ettiler. CDH1 geni E-cadherin şifreler, E-cadherinler ise hücre adezyon proteinleridir. Sporadik tümörlerde E-cadherinin geri düzenlenmesi zayıf prognosis ile ilişkilidir. Kateninler ve E-cadherin kaybı veya azalması, K-sam geni amplifikasyonu, C-met geni amplifikasyonu, siroza bağlı karsinoma veya zayıf farklılaşmış karsinomaların ilerlemesi ve gelişmesi için gereklidir (23).

Mide kanseri insidansı batı populasyonunda HNPCC'ye paralel olarak artar. İlginç olan E-cadherin mutasyonları ile ilişkili olan kalıtsal mide kanserinde genellikle diffüz tip yaygın iken HNPCC'de mide kanseri intestinal tiptir. İntestinal tip mide kanserinde  $\beta$  katenin geni ve APC'nin mutasyonel değişiklikleri ve artan  $\beta$  katenin mRNA seviyesi görülür. Bu yüzden promotör hipermetilasyonu vasıtasıyla E-cadherinin epidemik inaktivasyonu, farklılaşmamış tümörlerin gelişmesinde kritik olaylar olabilir (24).

APC mutasyonları diffüz tip mide kanserine göre intestinal tipteki mide kanserinde daha sıktır. APC geni sadece kolorektal kanserlerde yatkınlık geni değil, aynı zamanda mide kanserlerinin intestinal tipinde de yatkınlık genidir. APC geninin mutasyonu, intestinal veya kolonik farklılaşma için marker olarak düşünülebilir. İntestinal tip kanserlerdeki metaplazinin transformasyonu ile sonuçlanan teoriyi APC geni mutasyonunda destekler (24).

APC geni mutasyonları, kolorektal tümörenezise benzer şekilde mide adenoma gelişmesinin erken safhasında meydana gelir (5,6). Genetik instabilite, neoplastik transformasyon ve onun ilerlemesinde güçlü bir etkiye sahiptir (7). Bu şekildeki genetik instabilite gastrointestinal karsinomada iki formda sınıflandırılabilir. Bunlar;

hipermutabilite ile meydana gelen mikrosatellit instabilitesi ve kromozomal instabilitedir (25,12).

MSI repetatif/nükleotit sekanslarında yaygın instabilite tarafından karakterize edilen genetik değişikliğin önemli bir formudur. MSI, HNPCC ile ilişkili tümörlerin çoğunda bulunur. hMSH2, hMLH1, hPMS2 veya hMSH6 uygunsuzluk tamir genlerinde meydana gelen germline mutasyonlar HNPCC'ye sebep olur (17,18). Transforming growth faktör tip B (TGF-Br/O) reseptör geninin mutasyonları ve BAX geni MSI ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. MSI mideyi içeren diğer organların tümörlerinde çeşitli derecelerde etkilidir. Aynı zamanda MSI sporadik kolorektal tümörlerin %5-10'u civarında rastlanabilen bir özelliktir (15,16).

## 2.2. KOLON KANSERLERİ

Kolon yiyeceklerdeki su ve besinleri absorbe eder ve aynı zamanda artık maddeler için bir depo yeri olarak hizmet eder. Kolon aynı zamanda sindirim bölgesinin bir parçası olan büyük barsak olarak da bilinir (26).

Kanser kolonun dört bölgesinin herhangi bir yerinde gelişebilir. Kanser gelişiminden önce kolon da bazı değişimler görülür. Değişimin bir tipi polip olarak adlandırılan doku büyümesidir. Kolon polipleri aynı zamanda daima belirgindirler ve genellikle semptom üretmezler. Zamanla polipler kansere dönüşebilirler (27).

Kolon kanserinin %95'i adenokarsinomadır. Bunlar kolon içerisine uzanan hücre kanserleridir. Bazı diğer nadir tipleri de vardır, fakat adenokarsinomayla ilişkilidir (28).

Kanser bir hastalık değil hastalıklar grubudur. Kanser tüm formları vücuttaki bütün hücrelerin ve büyüme kontrolünün değişimine neden olur. Birçok kanser ilk başladığı vücut parçasından sonra adlandırılır. Kolon kanseri kolonda başlar (28).

## 2.3. KOLON KANSERLERİNİN GENETİĞİ

Kolon kanseri hem erkek hem de kadınlar için yaygın bir hastalıktır. Bireylerin %5'inde kolorektal kanser gelişir. Kolon kanseri sporadik, ve ailesel olmak üzere iki farklı şekilde gözlenebilir. Sporadik kolon kanseri tüm kolon kanserlerinin yaklaşık %70'ini oluşturur. Sporadik kolon kanseri genellikle 50 yaş üzeri bireylerde daha yaygın gözlenir. Hastaların %10'undan daha azı kolon kanseri için kalıtsal yatkınlığa sahiptir. Kolon kanseri polipozis ve nonpolipozis olmak üzere ikiye ayrılır. Polipozis sendromları, ailesel adenomatöz polipozis (Familial polyposis coli; FAP) ve



hamartomatous poliposis sendromdur. Nonpoliposis kolon kanser predominant sendromları ise HNPCC (Lynch sendrom I) ve ailesel kanser sendromudur (Lynch sendrom II). Yukardaki sınıflandırma kolorektal kanserlerin tüm tiplerinin biyolojisinin anlaşılmasında kolaylık sağlar (29).

**Tablo 2.2.** Kolon kanser gelişiminde etkili olan genler

Mutasyon Tipi	İçerdiği Genler	Hastalığın Tipi
Germline	APC MMR	Familial adenomatous polyposis; FAP HNPCC (Lynch sendrom)
Somatik	Onkogenler Myc Ras Srg Erb B2 Tümör supressör genler P53 DCC APC MMR genleri hMSH2 hMLH1 hPMS1 hPMS2 hMSH6 hMSH3	Sporadik hastalıklar
Genetik polimorfizm	APC	AJ kişilerindeki ailesel kolon kanseri

En yaygın kolon kanser sendromları, FAP ve HNPCC dir. Bunların her ikisinde spesifik bir yada birden fazla germline mutasyon sonucu oluşurlar. FAP, bir tümör supressör geni olan APC genindeki bir germline mutasyonla meydana gelirken, HNPCC, MMR'deki bir mutasyonla (ki, en yaygın olan mutasyon hMLH1 ya da hMSH2 dedir) ortaya çıkar. Tablo 2.2'de kolon kanser gelişiminde etkili olan genler görülmektedir (30).

### 2.3.1. P53 Geni

P53 geni 17. Kromozomun 13p (17p1.3) bölgesinde yer alan , 11 ekzon içeren bir tümör supressör genidir. Genin ürünü transkripsiyonel düzenleyici olarak görev yapar. Gen bir DNA bağlanma bölgesi, çekirdek lokalizasyon işaret bölgesi ve bir tetramerizasyon bölgesi içeren beş yüksek korunmuş bölgeden oluşur (31).

P53 insan kanserlerinde en çok mutasyona uğrayan genlerden biridir. Normal P53 geni, apoptozis (programlanmış hücre ölümü) indüklemesinde ya da replikasyon boyunca DNA onarımını kolaylaştırmada rol oynar (31).

P53 geninde oluşan mutasyonlar, kanser olgularında en sık rastlanan mutasyonların başında gelir. Örneğin kolon kanserlerindeki tümörlerin %75-80'inde P53 geni ve bitişik lokuslarda heterozigotluk kaybı görülmektedir. Ayrıca P53 ve bitişik lokuslar için heterozigotluk kaybı yalnızca kolon kanserinde değil, akciğer kanseri, meme kanseri, beyin tümörleri, hepatoselüler karsinom ve kronik miyeloid lösemi gibi diğer kanser türlerinde de bulunmaktadır (32). Kolon kanserlerinde P53 genindeki mutasyonlar genellikle 175, 248, 273 ve 282 pozisyonundaki CpG dinükleotitlerinde oluşur. Bu mutasyonlar nokta mutasyonu olup C-T transversiyonu şeklindedir. Normal olarak P53 proteini hücre siklusunu düzenlemek üzere DNA molekülüne bağlanmaktadır. Diğer tümör supressör genlerine ilişkin proteinlerinde benzer roller üstlendiği sanılmaktadır ve bu nedenle böyle proteinlerin yokluğu kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olur (33).

### 2.3.2. K-Ras Geni

K-ras-2 onkogeni, kolorektal kanserlerde tanımlanan ilk değişime uğrayan genler arasındadır (34). Normal c-ki-ras-2 protonkogeni kromozom 12p üzerinde lokalizedir ve 3 ekzon içerir. Bu gen GTPaz aktivitesine sahiptir. Ayrıca farklılaşma ve büyümenin kontrolünde, sinyal iletim yolu için moleküler alışverişte de görev alır (35).

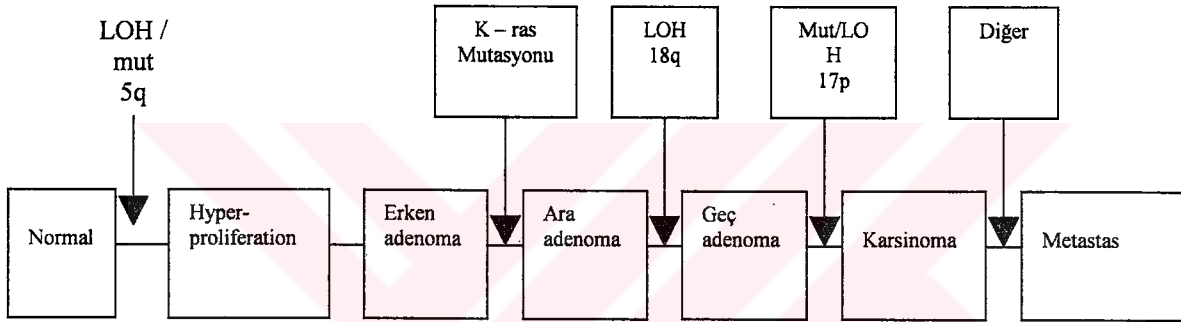
K-Ras geninin kodon 12, 13, 61 'deki' nokta mutasyonları kolorektal kanserde sık meydana gelir. Söz konusu kodonlar genin GTP bağlanma bölgesindedir. Bu kodonlardaki kritik mutasyonlar, hücre büyümesinin deregülasyonu ve sinyal iletiminin düzenlenmesine neden olabilir (36).

K-Ras-2 mutasyonları kolonda premalignant adenomatöz poliplerde yaygın olarak meydana gelir (37). Bu durum kodon 12'deki spesifik mutasyonların çoğunun,

malignant tümör tipleriyle ilişkili olabileceğini gösterebilir (38). K-Ras mutasyonları, kolonda neoplastik sekansa bağlı erken morfolojiksel olarak tanımlanan lezyonlarda sık meydana gelir (39). APC mutasyonlu hücrelerde oluşan ikincil Ras geni mutasyonu klonal yayılmayı kolaylaştırır. Başlangıç olayı olmamasına rağmen Ras geni mutasyonların kolon karsinogenezisinin oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir (40).

### 2.3.3. Kolorektal Karsinogenezisin Oluşum Basamakları

Kolorektal tümör gelişiminde bir çok gende farklı genetik değişiklikler meydana gelebilir. Şekil 2.1'de kolon karsinogenezisinde rol oynayan genler ve mutasyonlar verilmiştir (41).



Şekil 2.1. Kolon Karsinogenezisinin Oluşum Basamakları

Vogelstein ve arkadaşları malignant ve benign kolorektal tümörlerdeki genetik değişiklikleri incelediler. Neoplastik ilerleme esnasında farklı genlerde genetik değişikliklerin sayısında artış belirlediler (41).

Kolorektal karsinogenezisinin oluşum modelinde amacı APC lokusundaki genetik değişikliklerin , süreçte çok erken olaylar olduğunu ve sürecin sonraki aşamalarında kolorektal neoplaziyi oluşturan değişikliklerin sıralanmasıdır (42,43). K-Ras geni mutasyonlarının kolorektal adenoma, premalignant lezyon ve büyük tümörlerde yaygın olduğu bulundu (44). Ras mutasyonu neoplazide klonal yayılmayı kolaylaştırmada hizmet edebilir, fakat malignant fenotip gelişmesi için yeterli değildir (45).

Bu modelde 18q ve 17p'de LOH ve allelik kayıplar daha sonra meydana gelir ve malignansinin oluşması için kritik aşamayı başlatır (46).

Vogelstein ve arkadaşları kolorektal karsinomalarda allelik kayıpları araştırmak için restriction fragment length polymorphism (RFLP) kullanıldı. Çalışma sonucunda 53

tümörde, LOH veya allelik kayıpların birçok derecesi gözlemlendi. Tümörlerin %75'inden fazlasında kesin olarak 18q ve 17p kromozom kollarında allelik kayıplar tespit edildi. Tümörlerin %25-50'sinde ise 1q, 4p, 5q, 6p, 6q, 8p, 9q, 18p ve 22q sitelerinde allelik kayıplar gösterdiler (47).

MMR genlerinin hepsi (hMLH1, hMSH2, hMSH3, hPMS1, hPMS2 ve hMSH6) DNA replikasyon hatalarının düzeltilmesinde rol alırlar. Mikrosatellitler 10-100 kez tekrarlanan nükleotit bazlarının küçük sekanslarıdır. Mikrosatellitlerde transkripsiyon anormaliteler mikrosatellit instabilitesine neden olur. Mikrosatellit instabilitesi, HNPCC'li hastaların kolon kanseri dokularında sık olarak görülür (48).

Yukardaki genlere ek olarak diğer bazı genlerde kolon kanseri için önemlidir. Buna rağmen onların tam rolü ve etki mekanizması henüz bilinmemektedir. Bunlar COX-1 ve COX-2 olarak bilinen cyclooxygenase (COX) genleridir. COX-1, normal hücrelerin yapısal komponenti olmasına rağmen, COX-2 geninin ekspresyonu yalnızca kolon kanser hücrelerinde gözlenmiştir. COX-2 proteini programlanmış hücre ölümünde rol alması bakımından önemlidir. COX-2'nin ekspresyonunun yalnızca kolon kanser hücrelerinde gözlenmesi kolon kanserlerinin ve kolon poliplerinin önlenmesinde hedef duruma gelmiştir (48).

Diğer taraftan Peroksizom prolifer-aktivating reseptör gen (PPAR) kolon karsinogenezi ile ilgilidir. PPAR geninin görevi transkripsiyonel faktörler olan nüklear reseptörler ailesindedir. Ön çalışmalar gösterdi ki PPAR, APC geninin 3' kısmına yakın olabilir ve COX yolunda görev alabilir. Bu APC mutasyonlarının hücrel karsinogeneze sebep olmasını açıklayabilir (49,50).

G- protein reseptör ailesinden bazı reseptörler, kolon kanser büyümesi ile ilgilidir. Bu konu ile ilgili çalışmalar içinde muskarinik kolinerjik reseptör ve gastrin reseptörü yer alır. Gastrin , kolonik mukoza için bilinen trofili bir faktördür (51,52). Ayrıca anormal reseptör varlığında veya hipergastrinemik safhada tümörgeneziste bir role sahip olabilir (53,54).

#### **2.3.4. Ailesel Kolorektal Kanseler**

Kolonda çok sayıda adenomatöz polip geliştiren otozomal dominant bir hastalıktır. Adenomatöz polipler nadiren ince barsak ve mide de meydana gelebilir. FAP'lı bir hasta doğduğunda asemptomatiktir ve fenotipi normaldir (55).

Ailesel kolorektal kanserler (Familial Polyposis Coli; FAP), genç bireylerde sık gözlenir. Genetik değişiklik 5. kromozomdaki APC geninde oluşur ve bu değişim ailesel adenomatöz polipozis ya da FAP'tan sorumludur. APC normal olarak kolon tümör büyümelerini suprese eden bir gen dir. APC geninin protein ürünleri diğer genlerin ekspresyonunun düzenlenmesi ile hücre siklusunun düzenlenmesinde görev alır. FAP kalıtsal kolon kanserleri içerisinde mekanizması en açık bulunan ve en iyi anlaşılana dır. Buna rağmen FAP, tüm kolorektal kanserlerinin %1'inden daha azını kapsar. FAP'lı kişilerin kolonlarında yüzlerce bazen de binlerce polip gelişir. Çok sayıda gelişen bu poliplerin bazıları kanser oluşturur. Bir bireyde önce polip görülür ve tipik sendrom bulguları yaklaşık olarak 25 yaş civarı başlar (56).

Deneysel araştırmalar FAP'lı hastaların kolon epitelinde; kriptlerin apikal kısımlarında DNA sentezinin süprese edilmediği, ornitin dekarboksilaz aktivitesinde artma, tümör uyarıcılarına anormal cevap, artmış tetraploidiyi göstermiştir (57).

APC genindeki germline mutasyonlar, genellikle prematüre stop kodonları, delesyonlar ve çeşitli insersiyonlardan oluşur. Presemptomatik FAP hastalarının tanımlanmasını, APC genindeki germline mutasyonları belirlenmesi hastalığın tanısını kolaylaştırır (58).

APC büyük bir gen dir ve germline mutasyonlar genin her noktasında meydana gelebilir. Germline mutasyonların bir kısmı, APC'nin kodlayıcı bölgesinde bir stop kodonu meydana gelmesiyle oluşan prematüre translasyon ürünleridir. Prematüre proteinler hastaların %60-70'inde invitro transkripsiyon translasyon yöntemiyle ortaya çıkarılabilir. Bu yöntem FAP ve ailesel geçmişı olmayan çok sayıda polipe sahip hastalarda kullanışlı bir yöntemdir. Diğer taraftan FAP vakalarının %20-30'u APC lokusunda yeni mutasyonlar gösterir. Bu test onların tanımlanmasında da kullanılabilir(59).

FAP sayıca az olan poliplerin asemptomatik görünüşü ile başlar. Poliplerin bazıısı tedavi olmaksızın küçük kalır, bazıısı da kolonda iri başlı polipler yapar. Polipler villus adenoma, tübülovillüs yada tübüler gibi histolojik çeşitliliğe sahiptir. APC geninin ekson 15'de hot spot bir bölgesindeki mutasyon çok sayıda poliplerin olması ile ilişkilidir. FAP'ın kanser gelişimi profuse ve sparse olmak üzere iki tiptir. Profuse tipte kodon 1250 ve 1464 arasında germline mutasyon oluşur ve bu mutasyonlar beş bin yada daha fazla adenomatöz polip fenotipi oluşturur. Sparse tipte ise bu bölgeler dışında bir

germline mutasyon gelişir. Bu mutasyonların oluşturduğu polip sayısı profuse tipten çok daha azdır. Ayrıca FAP'ın profuse tipinde kanser gelişiminde ortalama yaş, sparse tipte düşünülenden daha gençtir (60).

FAP'ta ekson 1-7'de germline mutasyon meydana geldiğinde retinal pigment epitelyumunun konjenital hipertrofisi (CHRPE) hiç görülmezken, ekson 9-15'te meydana gelince görülür (61). Eğer APC geninin ilk üç ekzonunun birinde germline mutasyon meydana gelirse hastalık hafif formu sonuçlanır. Attenuated APC (AAPC) olarak adlandırılan bu durumda poliplerin sayısı azalır (62).

### 2.3.5. Kalıtsal Polip Oluşturmayan Kolorektal Kanser

Kalıtsal Polip Oluşturmayan Kolorektal Kanser (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer; HNPCC) 'nin genetik temelini araştırmak için sendromlu aileler ve HNPCC'li bireylerle çalışmalar sonucu çeşitli kriterler belirlendi. MMR genlerinden hMSH2'deki anormalliklerin HNPCC'ye sebep olabileceği yönünde karar alındı. HNPCC'den etkilenmiş kişiler kolorektal kanser gelişimi bakımından çok yüksek riske sahip olduğu bilinmektedir. HNPCC'de FAP'taki gibi çok sayıda polip gelişmez. HNPCC'li kişiler çok az sayıda polipe sahip olmasına rağmen bu polipler kansere geçişe çok eğilimlidir ve ilerlemenin oranı hızlıdır. Bunun sebebi muhtemelen, MMR geni mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar ile polipler başlar ve bu olay "hızlandırılmış tümörogenesis" olarak bilinir. HNPCC'de polip gelişimi 1-2'li yaşlarda meydana gelirken, sporadik kolon kanserinde genellikle 5-10 yaştan itibaren başlar. HNPCC'li kişilerde APC mutasyonlarından önce çok sayıda polip gözlenmiştir (63).

Kolon kanserinde risk MMR gen mutasyonlu kişiler için %85 kadar yüksektir. MMR gen mutasyonlu kadınlarda endometrial kanser için %40 risk vardır. Etkilenen kişiler için ince barsak, pankreas, genitoüriner sistem, hepatobiliary sistem, overi içeren diğer organların kanserleri içinde artan risk vardır. HNPCC'nin sebebinin açıklanmasına liderlik eden başlangıç gözlemleri, MSI gösteren HNPCC ilişkili kanserlerdir. Bilinen altı MMR geninin her birinin germline mutasyonları HNPCC'ye sahip akrabalar arasında tanımlandı. En çok görülen mutasyonlar kromozom 2p üzerinde bulunan hMSH2 geninde veya kromozom 3p'deki hMLH1 genindedir (29,64,65).

## 2.4. KOLON POLİPLERİ

Barsak mukozası yüzeyinde saplı veya sapsız (sesil) olarak bulunan çeşitli anatomik yapılardaki tümörlere polip adı verilir. Bu makroskopik görünüme dayanan klinik bir tarifdir. Önemli olan poliplerin mikroskopik yapısıdır. Çünkü poliplerin klinikte en önemli özelliği malign tümöre çevrilme potansiyelidir. Bu da mikroskopik yapılarına bağlıdır. Polipler yapısal kökenlerine, patojik ve anatomik yapılarına göre türlere ayrılırlar. Kalın barsakta birden fazla yada bir çok polip dağınık olarak varsa buna polipozis; dissemine polipozis veya diffüz polipozis denir (66).

Pratikte kalın barsak polipleri ya basit epitelyal hiperplazisi, gerçek adenoma veya yalancı adenomalardır. Adenoma kökenini bez epitelinden alan tümörlere denir. Adenoma veya adenomatöz bir bakıma polip veya polipozisin sinonimidir (67).

Poliplerin çoğu asemptomatiktir. Bu nedenle gerçek insidanslarının tayini güçtür. Sindirim sistemi semptomları bulunduğu için sigmoidoskopi yapılan yetişkinlerin %3.4-10.4'ünde polip bulunur. Türkiye'de bu oran %6.3'tür. Semptomlu ve semptomsuz şahıslar arasındaki polip insidansı farkı özellikle çocuklarda çok belirgindir (68).

Rektal kanamadan şikayet eden çocukların % 35'inde; asemptomatik çocukların ise sadece % 2'sinde polip tespit edilmiştir. Çocuklarda polip insidansı 5 yaşında en yükseğe ulaşır sonra puberteye kadar gittikçe azalır. Ondan sonra tekrar yavaş yavaş artarak 60-80 yaşlarında yeniden maksimuma ulaşır. 60 yaşındaki şahısların % 40'ında polip tespit edilebilir. Alkolik kişilerde polipe daha sık rastlanır (% 16.8). Polipli şahıslarda sonraki yıllarda yeni polip gelişmesi ihtimali normale göre 4 kat daha fazladır. (% 2.8).Bu nedenle polip tespit edilen şahıslar en az yılda bir sigmoidoskopi ve gerekirse radyolojik olarak muayene edilmelidir (69).

Adenomatöz poliplerin pratik önemlerini artıran iki özellikleri vardır.

1. Bu tümörlerin büyük çoğunluğu (% 60-90) rektumdan itibaren yukarı doğru 25-30 cm'lik kalın barsak kısmında yer alırlar. Bu tip poliplerin teşhisinde sigmoidoskopi kolay ve tehlikesiz bir tanı yöntemi olarak kullanılabilir.
2. Sözkonusu tümörlerin neoplastik epitelyal kökenli alanların kansere dönüşme insidansı son derece yüksektir. Saplı poliplerde kanser fokusu polipin tepesinde gelişmeye başlar (in situ kanser) ve bunun sapı aşır kolonu istila etmesi (invazif kanser)

için daha uzun bir zaman geçmesi gerekir. Halbuki sapsız poliplerde gelişen kanser fokusu daha kısa zamanda mukozayı istila eder (69).

Villöz adenomların malign potansiyeli daha fazladır. Bu adenomlar kolonda ne kadar uzun süre kalırsa, mevcut adenomların sayısı ne kadar çok ise ve bunlar ne kadar büyükse, kanser gelişmesi ihtimali o kadar artar. Polipler zamanla, yavaşta olsa, büyürler. Diğer taraftan, bir polipin kansere dejenere olup olmayacağını, önceden kestirmeye yarayacak, büyüklükleri dışında, makroskopik bir kriteri yoktur. Poliplerin dış görünüşlerinden malign dejenerasyonunun var olup olmadığı söylenemez. Çapı 1 cm'den küçük poliplerin %1'inde mikroskopik olarak invazif (saldırgan) kanser delilleri az görülür. Çapı 1-2 cm olanlarda bu oran %10, çapı 2 cm'den büyük olanlarda ise %50'dir. Bu nedenle her polip tanı konur konmaz çıkarılmalıdır (70).

Genç hastalarda başlangıçta az sayıda polip görülürken, sayı süratle artarak bütün kolon mukozası poliple kaplı hale gelir. Hastalarda ortalama 1000-5000 arasında polip olduğu belirtilmektedir. Olguların hemen hepsinde poliplerin çapı 0.5 cm'den küçüktür. % 1 oranında poliplerin 1 cm'den büyük olduğu görülür. Polipler adenomatöz tipte oldukları için doğal seyir sonucu 10-15 yıl içinde kaçınılmaz şekilde kolorektal kanser gelişir (70).

#### **2.4.1. Kolon Poliplerinin Etiyolojisi**

Bağırsak kanserleri, çoğunlukla kalın barsak ve rektumun yüzeyini kaplayan epitel doku hücrelerinden kaynağını alırlar. Sindirim borusunun besinlerle temas eden yüzeyinde epitel doku, aşırı yıpranma nedeniyle, sürekli olarak yenilenen bir dokudur. Bu nedenle barsak kıvrımlarının derinliklerinde saklı olan kök hücreleri düzenli bir biçimde yeni hücreler üreterek, hücre kaybını yaşlanmaya, böylece bağırsağın bilinen düzenli pürüzlü yüzeyini korumaya çalışırlar. Ancak zamanla ve yaşlanmayla orantılı olarak, bu dengeli yenileme işlemi bozulmaya yüz tutar. Hücre yenileme işlemi, kaybedilen hücre sayısından daha fazla sayıda hücre üretme yönünde bozulduğu zaman, barsak yüzeyinde polip oluşmaya başlar (71).

Poliplerin oluşunda; iltihap, kronik irritasyon, primer epitel hiperplazisi, subepiteliyal alanda primer lenfoid doku agregatları, embriyonik defekt gibi faktörler rol oynar. Ama bu faktörlerin hiç birisi bütün poliplerin oluşunu izah edemez (71).



### 2.4.2. Kolon Poliplerinin Patolojisi

Poliplerin patolojisi tam ayrıntılı olarak henüz bilinmemektedir. Duker'e göre tübüler adenomatöz polipler kökenlerini Lieberkuhn kriptlerinin diplerinde oturan barsak müküs bezlerini örten derin glandüler epitel hücrelerinden alırlar; önce submukozada bir nodül teşekkül eder. Bundan sesil veya çok kısa saplı bir polip gelişir. Barsak peristaltik hareketlerinin ve fe esin üstünden geçiŐin traksiyonu ile bu pedikül sonraları uzar. Villöz adenomalar ise kökenlerini süperfisyal glandüler epitel hücrelerinden alırlar; sağa ve sola çok kollar vererek büyürler (72).

Polipin baŐlıca klinik belirtileri; Rektal kanama, karın ağrısı ve karında kramplar, feçesle müküs itrahi, polipin anüsten dıŐarı protrüzyonu, ağrılı ve g   defekasyon ve diyaredir (72).

En önemli belirti rektal kanamadır. Hastaların 2/3' nde bulunur. Ani ve büyük kanamalar nadirdir. Mutant olan yavaş yavaş ve azar azar olan kan kaybıdır. Kanama aralıklıdır. Fe este kırmızı kan görünce bunun sebepleri arasında mutlaka polip d Ő n lmelidir (72).

Rektuma yakın olan poliplerde sigmoidoskopi; daha yüksekte oturan poliplerde fiber-sigmoidoskopi, kolonoskopi ve radyolojik olarak kolonun çift kontrast incelenmesi ile tanı konur. Alınan biyopsinin mikroskopik yapısına dayanarak tipi tayin edilir (72).

### 2.5. KANSER VE GENETİK

Kanser terimi tek bir hastalık adı olmayıp temel nedeni, kontrolsüz büyüme olan malign tümörlerin tümüne verilen bir addır. Hücre çoğalması sonucu bir kitle haline gelen tümör (neoplazma) kendini saran komŐu hücrelere de saldırır. Hastalığın sonraki evrelerinde tüm vücudu sarar buna "metastas" denir (33).

Kanserde temel sorun hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybolmasıdır. Çoğalma ya da büyüme, gen kontrolü altında olduğuna göre genetik faktörlerde tüm kanser türlerinde etkilidir Őeklinde bir genelleme yapılabilir. Bununla beraber, bazı kanser türlerinde primer faktör olarak herhangi bir anormal gen sorumlu tutulmakta, dolayısıyla kontrolsüz hücre çoğalması sekonder faktör durumunu almaktadır. Fakat hangi faktör etkili olursa olsun tüm kanser türlerinin somatik hücrelerdeki mutasyon ya da mutasyonlar sonucu oluŐtuĐu ve mutasyonlarında bir seri genin ekspresyonunu etkilediği artık bilinen bir gerçektir (33).

Her tümör, hücresele DNA molekülündeki bir ya da daha fazla mutasyon sonucu ortaya çıkar. Kanserli hasta grubunun küçük bir bölümünü oluşturan kalıtsal kanserlerde etkili olacak ilk mutasyonlar kalıtsaldır, yani doğumdan önce ilgili mutasyonlar tüm hücrelerde bulunmaktadır. Buna karşılık hastaların büyük çoğunluğunda kusur, doğumdan sonraki dönemlerde sınırlı sayıdaki somatik hücrelerde ortaya çıkar. Kanser oluşumunda etkili olan üç tip gen bulunmaktadır :

1. Tümör supressör genler (Anti-onkogenler)
2. Onkogenler
3. Diğer genler

### **2.5.1. Tümör Supressör Genler (Anti-Onkogenler)**

Tümör supressör genler ilk kez retinoblastom üzerinde yapılan çalışmalar sonucu keşfedilmiştir. Retinoblastom çocukluk dönemi göz kanserleri içerisinde en sık rastlanan kanser türüdür. % 20 – 30 olguda her iki gözde de ortaya çıkar. Bilateral olguların tamamı ile ünilateral olguların % 15 kadarı otozomal dominant kalıtım göstermektedir. Bu hastalıktan sorumlu olan RB1 geni 13 numaralı kromozomun uzun kolunun proksimalinde yerleşmiştir ve tümör dokusundaki hücrelerde bu gene ilişkin fonksiyonel protein bulunmamaktadır. Bu otozomal dominant özelliği oluşturan mutasyon, gen çiftinin yalnızca birinde ortaya çıkmıştır ve bu mutant geni taşıyan kişide tümör gelişebilmesi için retina hücresindeki mutant geni normal eşinde de (normal allel) bu kusurun oluşması gerekir (33).

Tümör supressör genler için p53, RB1, p16, BRCA1, BRCA2, APC, WT1, VHL genleri de örnek verilebilir (73).

### **2.5.2. Onkogenler**

Onkogenler normal hücrelerin büyümesini ve gelişmesini etkileyen genlerdir. Eğer bir onkogen kendiliğinden gen içindeki bir mutasyon ya da eksternal kontrolün değişmesi sonucu farklılaşır ya da normalden daha fazla ifade edilmeye başlarsa bu değişiklikler hücrede kontrolsüz büyüme ve dolayısıyla malignansiye neden olur. Onkogenlerin büyük bir bölümü hücre çoğalması ve farklılaşmasının kontrolü ile ilişkili proto-onkogen denen normal genlerin mutasyona uğramış (aktive edilmiş) formlarıdır (73).

İnsan kanserlerinde en sık bozulmaya uğrayan onkogen ras onkogenidir. Bunu myc, siklin D, ret, erb-B, bcl 2, mdm 2, abl, gibi diğer onkogenler izler. Bu genlerden bir kısmı hücre çoğalmasını doğrudan düzenlemektedirler. Diğer kısmı ise hücreye sürekli çoğal sinyali gönderen proteinleri sentezlerler (73).

İnsan onkogenleri kromozomal yeniden düzenlenmeler sonucunda da aktivite edilebilirler. Tümör süpressör genler ve onkogenler normal hücrelerin büyüme ve gelişmesinde önemli görevler üstlenmişlerdir. Bazı onkogenler büyüme faktörleri üretirler, bazıları da birkaç hormon ve büyüme faktörü reseptörü ile ilişkili olan tirozin fosfokinaz enzimi aktivitesine sahiptir (74).

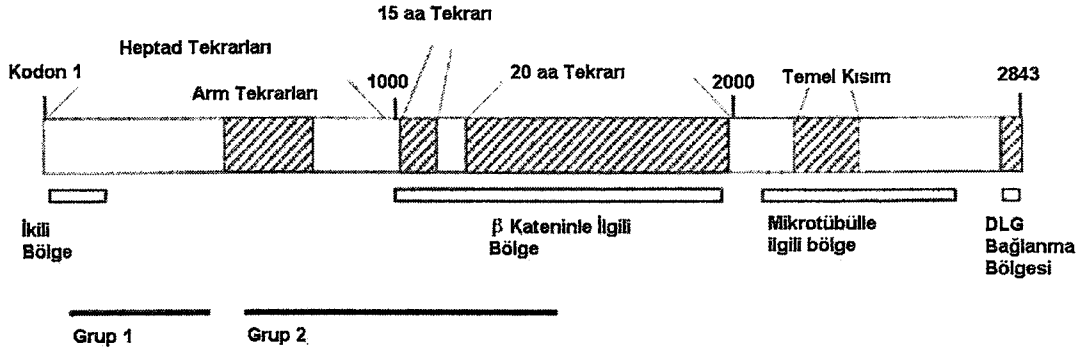
## 2.6. ADENOMATOUS POLİPOSİS COLİ GENİ

APC geni ilk kez 1986 yılında tanımlanmıştır (75). Kromozom 5q21'in klonlanması ile 1991'de genin lokusu belirlenmiştir. APC geni 21 ekzon içerir, yaklaşık 8500 bp büyüklüğündedir ve moleküler ağırlığı 312 kD olan 2843 amino asitten oluşan bir protein kodlar. Bu ekzonlar içinde en önemli olanı 15. ekzondur. Ekson 15, APC'nin kodlayıcı sekanslarının % 75'inden fazlasını kapsar ve ekson 15 hem germline hem de somatik mutasyonların en sık görüldüğü bölgedir (76).

APC gen ürünü hücre içi sinyal yolundaki E-cadherin'i içerir. E-cadherin hücrelerin birbiri ile olan temasını etkiler. Kateninler, E-cadherin proteininin sitoplazmik kuyruklarına bağlanır. Alfa-Katenin ve Beta-Katenin APC ürününe bağlanır. APC proteinin değişimi hücre içi sinyal iletişiminin bozulmasına neden olur. APC fonksiyonunun kaybı serbest  $\beta$ -Kateninin artmasından dolayı hücre-hücre adezyonunun olası bir stabilizasyonu ile hücrel göçü bozar. Hücre proliferasyonundaki gözlenebilir bir artış polip oluşumuna yol açar ve karsinogenizis için aşamayı başlatır (76).

Pek çok germline APC mutasyonları genin kodon 1598'in 5' ucunda meydana gelir. Bu mutasyonlardan bazıları sonucu APC proteini kısalır. Mutasyonlar genin 3' ucunda nadir olarak görülür. FAP'ın kolorektal ve ekstraintestinal olarak belirlenmesi APC gen mutasyonun pozisyonu ile ilişkilidir. Retinal pigment epitelyumun konjenital hireptrofisi (CHRPE) genellikle kodon 1444'ün 3' ucu ve kodon 302'nin 5' ucundaki mutasyona sahip hastalarda yoktur. Kodon 1285 ve 1465 arasındaki APC proteinin kesilmesi polipozis ile ilişkilidir. Dezmoid tümörler kodon 1445-1578'deki mutasyonlu

FAP'lı hastalarda siktir. Kodon 1578'in 3' ucundaki mutasyonlar FAP'ta nadir görülrler (75).



Şekil 2.2. APC geni şeması

### 2.6.1. APC Genindeki Germline Mutasyonlar

FAP hastalarının çoğunda APC'nin germline mutasyonları gösterilmiştir. Bunların % 95 kadarı nonsense ya da anormal fonksiyonlu kesik protein üretimiyle sonuçlanan frameshift mutasyonlardır. Knudson'un iki-vuruş hipotezine göre FAP hastalarındaki kolorektal tümörler germline mutasyonlarına ilave olarak aynı lokusta somatik APC mutasyonu yada heterozigotluk kaybı sonucu oluşurlar (77-79).

En yaygın germline mutasyonlar kodon 1061 ve 1309'da gerçekleşir. Bu mutasyonlar diğer mutasyonlar arasında üçüncü sırasındadır (80,81). APC'nin germline mutasyonları en sık kodon 200 ve 1600 arasındadır (82).

### 2.6.2. APC Genindeki Somatik Mutasyonlar

APC geni aydınlatılmadan önceki LOH çalışmaları sporadik kolorektal tümörögenезisle karıştırılmıştı (83). Somatik mutasyonlar, sporadik kolorektal kanserlerin çoğunda APC allelinin yabancı tipinin kaybına yol açar (77-80). APC mutasyonları erken kolorektal tümörögenезis sırasında meydana gelir. Somatik mutasyonlar, 5 mm'den küçük adenoma içeren kolorektal adenoma ve karsinomanın büyük çoğunluğunda gözlenmiştir (78). Gerçekte APC'nin her iki allelinin inaktivasyonu kolorektal kanserlerde çok yaygındır. APC'deki tüm somatik mutasyonlarının yaklaşık % 60'dan daha fazlası

kodon 1286 ve 1513 arasındadır. Bu bölgeler genin kodlayıcı sekansının % 10'nundan daha az kısmı içerisindedir (79). Bu bölge (Mutation Cluster Region; MCR) olarak adlandırılır. MCR içerisindeki kodon 1309 ve 1450'deki somatik mutasyonlar için iki kritik nokta vardır (76). MCR bölgesi mutasyonları sonucu,  $\beta$ -katenin bağlayıcı bölgesinin aktivitesinin düzenlenmesinde bozukluklar ortaya çıkar (78).

APC proteinin sinyal iletim yolunda bir integral proteindir. Proteinin ürünü çeşitli fonksiyonel kısımlar içerir. Bunlardan bazıları beta-katenin bağlayıcı ve beta-katenin için degradasyon bölgesi olarak yer alır. Bu bölge sitoplazmik beta-katenin seviyesinin sabit tutulmasını sağlar. Beta-katenin, doku yapısının organizasyonunda ve polaritesinde rol alır. Bu E-cadherin aktivasyonu için önemlidir ve aynı zamanda embriyonik gelişim boyunca hücre göçünü ve morfogenezini etkileyerek hücre modülitesini kontrol eder (84).

### **2.6.3. APC Geni Promotor Metilasyonu**

APC geni iki promotor bölgeye sahiptir. 1A ve 1B (84). Promotor 1A çok aktiftir. APC'nin promotor 1A bölgesinde, kolorektal kanserlerde ağır metilasyonun gösterilmesine rağmen adonmada gösterilemedi. Son yıllardaki çalışmalarda ise, hem karsinomalarda hem de kolorektal adenomaların her ikisinde APC protomotorunun hipermetilasyonu gösterildi. Fakat bitişik normal kolonik mukozada gösterilemedi (85).

APC promotor 1A hipermetilasyonu hepatik kanserler, pankreatik, gastrik, özophagusu içeren diğer insan gastrointestinal tümörlerin bir kısmında da açıklanmıştır (86,87).

APC 1B promotorunun epigenik mekanizması için kanıt yoktur. Buna rağmen kolokteral tümörlerdeki APC lokusundaki LOH ve APC mutasyonlarının üstünlüğü bu prosesdeki major bir olay olan hipermetilasyon için bir ipucu olabilir (88).

### **2.6.4. APC Geni ve $\beta$ -Kateninin WNT Sinyalindeki Roller**

$\beta$ -katenin fosforlanmamışsa ve bu yüzden yıkılmamışsa hücre sitoplazmasında ve nükleusunda birikir (88).  $\beta$ -katenin'in birikmesi, APC'nin inaktivasyonu vasıtasıyla veya  $\beta$ -katenin'in kendi kendine direk mutasyonu ile ortaya çıkar. Bu birikme wnt sinyalinin sonucundan dolayı olabilir (89,90). Nükleus içindeki  $\beta$  katenin, T cell factor (TCF)'ün üyeleriyle ve transkripsiyonal aktivatörlerinden lymphoid enhancer factor (LEF) ailesiyle ilişkilidir (91). TCF4 bağırsak epitelyal hücrelerinin çekirdeğinde ifade edilir (92).  $\beta$ -katenin ve TCF/LEF hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eden

kompleksi meydana getirir (93,94). GSK3 $\beta$  aracılığıyla fosforilasyon,  $\beta$ -katenin parçalanmasını önleyen APC veya CTNNB1'deki ( $\beta$ -katenin kodlayan gen) mutasyonlar;  $\beta$ -katenin transkripsiyon aktivasyonu (95,96) ve  $\beta$ -katenin birikmesine yol açar (97-100).

$\beta$ -katenin beraberce hareket eden en az iki ayrı transkripsiyonal aktivasyon domainine sahiptir (TAD'lar).  $\beta$ -katenin üzerindeki TAD'lar transkripsiyonel aktivasyon alanı içerisinde yer alan TATA bağlayıcı proteinle reaksiyona girer (101).  $\beta$ -katenin vasıtasıyla transkripsiyonel aktivasyonunun hedefi, hücre siklus ilerlemesini regüle eden, c-myc (102) ve siklin D-1 onkogenlerini kapsar. Diğer muhtemel hedefler metalloproteinaz matrislin ve gap junctional protein connexin 43'ü içerir. En son bulgular TCF4/ $\beta$ -katenin kompleksinin transkripsiyonel bir hedefinin de TCF 1 olduğunu gösterdi (103,104).

Dilhman ve arkadaşları çeşitli polipozisle ilişkili olan APC gen ürünlerinin, dominant-negatif etkisi için deneysel oluşumlar sağladı. Beta-katenin/ TCF'nin aracılık ettiği transkripsiyondaki yabancı tip APC aktivitesi, kodon 1309'da kesilmiş bir mutant APC gen ürünü tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilir. Buna zıt olarak zayıflatılmış mutant APC gen ürünleri (örneğin kodon 386 ya da 1465'i içeren) yabancı tip APC aktivitesi ile sadece zayıf bir şekilde engellenir. Bu sonuçlar, FAP hastalarında genotip-fenotip korelasyonu için moleküler bir açıklamayı öne sürer. Kolorektal tümör büyümesinin MCR'deki bir mutasyonun seçilmesiyle sürdürülebileceğini destekler (105).

### 2.6.5. Çekirdekdeki APC Geninin Fonksiyonel Rolü

$\beta$ -katenin sitoplazmada bulunduğu gibi bazen de çekirdekte bulunabileceği gözlenir (106-108). Son zamanlarda yapılan çalışmalarla,  $\beta$ -kateninin çekirdekle sitoplazma arasında mekik yaptığı gözlenmiştir (109,110). Çeşitli çalışmalarla çekirdek geçiş sinyalleri (Nüclear Export Signals; NES)'leri açıklanmıştır. Henderson üç NES molekülünü aminoasitler 68-77, 165-174 ve 1472-1481'de tanımladı. Yalnızca ilk iki NES fonksiyonel olarak daha aktif gösterilmiştir. Bunlardan da 165-174'e göre 68-77 NES'i daha güçlü export aktivitesine sahiptir (109).

$\beta$ -katenin çekirdek poruna aksamına direkt olarak bağlanır. Böylece bir çekirdek konum sinyalinden bağımsız olarak çekirdeğe geçebilir. Diğer taraftan APC, çekirdek

konum sinyalinin (Nükleer Localization Signal; NLS) yoksun olarak çekirdeğe giremeyecek kadar büyüktür ve enerji bağımlı bir olarak transport olur (111).

Zhang ve arkadaşları APC geninde 1767-1772 ve 2048-2053 olmak üzere iki adet NLS bulmuşlardır. NLS'lerin fosforilasyonunun APC'nin çekirdek içine girişini durdurduğunu ve böylece çekirdek sitoplazma taşınmasının ayarlanabileceğini göstermişlerdir (109,112).

#### **2.6.6. APC Geni ve Apoptozis**

Sağlıklı bir insan kolonunda APC ekspresyonu kriptin luminal parçasındaki hücrelerle sınırlandırılmıştır (113,114). Hücreler apoptoze maruz kaldıktan sonra luminal yüzeyden dökülür. Hücreler arası kontakt ve spesifik sitokinez, kolonik epitelyal hücrelerde apoptoze karşı koruma sağlar. Adenomatöz epitelyal hücreler, apoptozisin düzensiz örneklerini gösterir fakat apoptozis sinyallerine hassastırlar (115).

Apoptozisin düzenlenmesinde APC'nin indirekt olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Kanseri hücrelerinde ve mutant APC'lerde, APC'nin yabancı tipinin ekspresyonunun indüklenmesi ile apoptozisin arttığı gösterilmiştir (116). Bir kanıya göre; APC'nin bir bölgesi  $\beta$ -katenin bağlanmasına ve degradasyonuna aracılık eder. Aynı bölge ile apoptozisin düzenlenmesinde de rol alabilir. Kolonda apoptozis, hücreler arası kontakta yada hücre dışı matriksten (ECM) hücrelerin serbest bırakılmasıyla ilişkilidir (117). Bu yüzden onun ECM ve hücre içi adezyonda indirekt bir etkiye sahip olduğu kabul edilir ve apoptozis için uyarı sağlar (118,119).

#### **2.6.7. APC Geni I 1307 K Mutasyonu**

1997 yılında John Hopkins araştırma grubu APC I1307K olarak adlandırılan bir mutasyon buldu. Araştırmacılar Ashkenazi Jewish popülasyonunun % 6'sının bu gen mutasyonuna sahip olduğunu söylemektedirler. Mutasyon taşıyan kişilerde kolorektal polip ve kanserin gelişmesinde artan bir riske sahiptir (120-122).

APC I1307K mutasyonu otozomal dominant kalıtım gösterirler. APC I1307K gen mutasyonlu bireyler, çocuklarının her birine gen mutasyonunu % 50 geçirme şansına sahiptirler. Hasta olmayan bireyler kendi çocuklarına mutasyonu geçirmezler (123).

Kodon 1307'nin germline mutasyonu sonucu izolösin şifreleyen (ATA:K) lizin şifreleyen (AAA:I) dönüşür. Bu nedenle bu mutasyonun ismi I1307K olarak adlandırılır. Bu değişimin nötral varyant olabileceğine inanılır. Bu nedenle APC

proteininin fonksiyonu değişmez, bu hem mutasyon hem de polimorfizm olarak isimlendirilir (124).

Bu stabil olmayan bölge hastaların % 50'sinde somatik mutasyonlar sonucu oluşur. 1307 alleli için pozitif APC geni, tümör DNA'sındaki kodon 1296 ve 1317 bölgesindeki somatik mutasyonun oranını belirgin şekilde artırmaktadır (125).

APC I1307K mutasyonunun en yaygın büyüklüğü (%90) APC proteinin inaktivasyonuna ve kısaltılmasına yol açar. APC I1307K missense mutasyonu kodlanmış proteinin fonksiyonunu değiştirmez. Bu mutasyon kolorektal kanser gelişimini kolaylaştırmak ve genin küçük bir hipermutabil bölgesini oluşturmak ile görevlidir (125).

APC I1307K mutasyonu ve FAP'a neden olan mutasyonların her ikisi de APC geni olarak adlandırılan aynı gende oluşur. FAP'lı bireylerde yüzlerce yada binlerce olabilen polipler kolon veya rektumda gelişmektedir. Bu yüzden yüksek kolorektal kanser oluşturma riskine sahiptir. APC I1307K mutasyonu diğer APC mutasyonlarından farklılık gösterir. Çünkü, mutasyonun kendisi kolon kanserine neden olmaz. Bunun yerine bu mutasyon kolon kanserine neden olabilecek genetik değişikliklere karşı çok hassas olan bu gende stabil olmayan bir nokta olarak hareket eder (126).

Bu tezin amacı; kolorektal ve mide karsinomasında APC I1307K mutasyonun belirlenmesi, çalışmaya katılan hastaların genotiplerinin belirlenmesi, hastalara danışmanlık ve hastalık seyri konusunda yardımcı olmaktır.



## **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **3.1. ÖRNEKLERİN ALINMASI**

Çalışmamızda mide ve kolon karsinoması ön tanısı alan hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından kan ve doku örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır. EDTA'lı 2 ml kan ve kolon poliplerinin çıkarılması ile elde edilen doku materyali DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

### **3.2. DNA ELDESİ**

#### **3.2.1. Periferik Kandan DNA Eldesi**

EDTA'lı 1 ml kan alınarak falkon tüpüne aktarıldı. Kan üzerine 3:1 hacimde +4 °C'de olan Red cell lizis solüsyonu eklendi ve yaklaşık 20 dakika oda ısısında ara sıra alt üst edilerek bekletildi.

1. Tüpler sonra 2500 rpm'de 12 dakika sentrifüj edildi ve böylece bir önceki aşamada parçalanmış olan kırmızı kan hücrelerinin (alyuvarlar) süpernatanttan atılması sağlandı. Dipte çekirdekli kan hücreleri (lökositler) kalır, bu hücrelerdeki DNA elde edilecek olan materyaldir.
2. Dipteki pellet iyice vortexlenir üzerine ilk aşamadaki kan miktarı kadar yani 1 ml oda ısısında cell lizis solüsyonu eklendi ve bir gece 37 °C'de etüvde inkübe edildi.

3. İnkübasyon sonrası homojenize olan çözelti, yeniden vortekslendi, 1/3 hacim protein pressipitasyon (amonyum asetat) çözeltisi ilave edildi ve yeniden vortekslendi.
4. Bu çözelti 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.
5. Daha sonra süpernatant kısmı başka bir falkon tüpüne alındı ve üzerine bununla aynı hacimde izopropanol ekledi ve alt üst edildi. DNA bu aşamada gözle görülebilir hale gelir.
6. DNA'nın dipte çökmesi için 4000 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi.
7. Süpernatant atılıp, DNA 1 ml % 70'lik etanol ile yıkandı ve yeniden 4000 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı dipte çökelen DNA oda ısısında falkon tüpünün kapağı kapatılmadan kurutmaya bırakıldı.
9. Kurutulan DNA üzerine, çözülmesi için 200 (mikrolitre) µl distile su veya TE tamponu eklenerek ependorf tüpe alındı.

### **3.2.2. Dokudan DNA Eldesi**

Mercimek büyüklüğündeki taze doku parçası makasla parçalandıktan sonra 375 µl Çekirdek parçalama tamponu eklendi. Üzerine 25 µl proteinaz K (25 mg/ml) eklendi. Vortekslendikten sonra 37 C°de homojenize olana kadar su banyosunda bekletildi (homojenize olma süresi içinde belli aralıklarla proteinaz K eklendi). Bu işleme doku tam olarak homojenize olana kadar devam edildi. Homojenizasyon sağlandıktan sonra eşit hacimde fenol-kloroform (1:1) karışımı eklendi ve vortekslendi. 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı eşit hacim izopropanol içerisine alındı, alt üst edildi ve DNA görülür hale geldi. 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi, üst kısmı atıldı dipteki DNA pelliti % 70'lik etanol ile yıkandı, kısa bir santrifüjden sonra etanol uzaklaştırıldı. DNA pelliti kurumaya bırakıldı, pellet kuruduktan sonra üzerine 50 µl distile su eklendi (127).

### 3.3. I. PCR BASAMAĞI

DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR)'nda Çoğaltılması; 9025 katalog numaralı Pronto APC gen testi kiti protokolu gereğince şu aşamalarla yapılmıştır.

1. 2 µl hasta DNA'ları ependorf tüpe alındı ve tüp etiketlendi.
2. Üzerine 13 µl Amplifikasyon mixi eklendi.
3. Aynı ependorfa 0.25 µl Taq DNA Polimeraz (5U/µl) eklendi ve pipetasyon yapıldı. Bu karışım üzerine 1 damla yağ damlatıldı. Bu PCR tüpü içerisindeki karışım aşağıdaki programda belirtildiği gibi PCR'da amplifikasyon işlemine tabii tutuldu. Böylece 290 baz çifti (bp) uzunluğa sahip APC gen bölgesi çoğaltıldı. Bu işlem herbir olgu için yinelendi.

94 °C	30 saniye	}	35 Döngü
53 °C	30 saniye		
72 °C	30 saniye		

PCR işlemi sonrası amplifikasyonun kontrolünü yapmak için % 2'lik agaroz jelde 5 µl amplifiye edilmiş olan ürün, yükleme tamponu ile boyanarak elektroforezde 75 voltta yaklaşık 30 dakika koşuruldu. Görülmesi beklenen bantın boyutu 290 baz çiftidir.

### 3.4. PCR'DA İNKÜBASYON BASAMAĞI

1. Önceki aşamada kontrol edilmiş olan ürünlerden 5 µl yeniden temiz bir ependorf tüpüne alındı ve etiketlendi.
2. Bunun üzerine 15 µl pronto buffer 2, 0.7 µl solüsyon C, 0.5 µl solüsyon D eklenip pipetasyon yapıldı.
3. Bu tüp üzerine 1 damla yağ damlatıldı.
4. Aşağıdaki PCR programında inkübasyon yapıldı. İnkübasyon ilk basamakta çoğaltılmış olan APC gen bölgesi fragmentlerini denatüre etmek için gereklidir.

37 °C	30 dakika	}	1 Döngü
95 °C	10 dakika		

### 3.5. II. PCR BASAMAĞI

İnkübasyon sonucu elde edilen ürünler ile bu aşamaya devam edildi.

Üründen 8 µl alınarak Pronto Plate adı verilen özel bir ortamın iki kuyucuğuna aktarıldı. Pronto plate'de her bir olgu için iki adet kuyucuk bulunur. Bu kuyucuklardan biri mutasyon (3920) diğeri ise Wild (yabani/normal tip) mutasyona uğramamış gen bölgesini tespit etmek içindir.

Kuyucuklara alınan 8'er µl inkübasyon sonrası ürünler üzerine 1'er damla kırmızı boyalı yağ damlatıldı.

Bu şekilde hazırlanan Pronto Platelere kapak ısısı 90°C'ye gelen aşağıdaki PCR programı ortamına alındı.

94 °C	15 saniye	} 20 Döngü
94 °C	30 saniye	
60 °C	10 saniye	

### 3.6. ELISA ÇALIŞMA BASAMAĞI

Bu aşamada çeşitli solüsyonlar kullanılarak ürünler kolorimetrik olarak ölçülebilecek aşamaya geldi. PCR'da inkübasyon sonucu elde edilen ürünler denatüre olmuş durumda olduğundan, ürünlerin kararlılığı bozulmaması için hemen sonraki aşamaya geçildi.

Pronto Plate'ndeki kuyucukların dibindeki ürünlere 100'er µl assay solüsyonu kuyucuk dibine verilerek aynı anda yeniden geri çekildi. Bu işlem sırasında multipipet kullanıldı. Geri alınan bu ürünler tespit plate adı verilen yeni bir ortama aktarıldı. Bu ortam streptoavidin ile kaplıdır ve bu yeni ortama aynı zamanda elisa kuyucuğu da denir. Bu aşamada primer uzama basamağının ürünlerini görebilmek için bir elisa prosedürü yerine getirildi, biyotinle etiketlenmiş olan ürünler streptoavidin kaplanmış elisa kuyucuğuna antijen antikor etkileşimine uygun şekilde bağlandı.

10 dakika karanlık bir ortamda bekletildi ve bu süre sonunda bağlanmanın olmadığı veya zayıf olduğu etkileşimleri ortamdan ayırmak için özel yıkama solüsyonu (1x yıkama solüsyonu) ile yıkama yapıldı.

Yıkama sonucu plate kuyucuklarına hrp'li assay solüsyonu verildi. Her kuyucuğa multipipetle 100 µl hrp'li assay solüsyonu eklendi ve 10 dakika karanlık bir ortamda bekletildi. Bu basamaktaki amacımız daha önceki aşamalarda yapılan etkileşimlerin tespiti şeklindedir. Primerin 5' antijen kısmına yönelmiş olan hrp etiketli antibadi ile etkileşerek bu işlem yapılmış olur.

10 dakika sonunda yine zayıf etkilenenleri ya da etkileşimin olmadığı oluşumların ortamdandan ayrılması için yıkama işlemi yapıldı.

Daha sonra her kuyucuğun üzerine 100'er µl substrat eklenerek 15 dakika karanlıkta bekleme yapıldı. Bu aşama sonrası platelerde renk değişimi meydana geldi.

### **3.7. SONUÇLARIN ANALİZ EDİLMESİ**

Sonuçlar elisa okuyucusunun (spektrofotometre) kullanılması ile ölçüldü. Önceki aşamada meydana gelen kolorimetrik değişim 620 nanometre (nm) dalga boyunda bir ışığın kuyucuktan geçirmesi ile ölçüldü.

### **3.8. ÇALIŞMA SÜRESİNDE KULLANILAN SOLÜSYONLARIN HAZIRLANIŞI**

#### **3.8.1. Red Cell Lizis Solüsyonu**

155 Mm	Amonyum klorür (MA = 53.49)
10 mM	Potasyum hidrojen karbonat
1 mM	Edta

#### **3.8.2. Cell Lizis Solüsyonu**

25 mM	Edta
% 2'lik	Sds

#### **3.8.3. Protein Pressipitasyon Solüsyonu**

10 mM	Amonyum asetat
-------	----------------

#### **3.8.4. TE Tamponu**

10 mM	Tris/HCl pH: 8.0
1 mM	Edta

**3.8.5. Nüklei Lizis Solüsyonu**

10 mM Tris/HCl pH: 7.5

0.44M NaCl

2mM Edta pH: 7.2

**3.8.6. 10x TBE Solüsyonu**

108 gr Tris

55 gr Borik asit

7.31 gr Edta tartılarak distile su ile 1 litreye tamamlanır.

**3.8.7. %1'lik Etidyum Bromid**

0.2 gr etidyum bromid hassas terazide tartılıp 20 ml'ye distile su ile tamamlanır.

**3.8.8. 1X Yıkama Solüsyonu**

25 ml 20X yıkama stok solüsyonundan alınarak 500ml'ye distile su ile tamamlanır.

**3.8.9 %2'lik Agaroz Jel Hazırlanması:**

2 gram (gr) agaroz, hassas terazide tartılarak 1X tbe tamponu ile 100ml'ye tamamlandı, kaynatılarak erimesi sağlandı. Jel kalıbına dökmeden önce yaklaşık 65°C'ye kadar soğutuldu. İçerisine etidyum bromür eklendi, karıştırıldı ve jel kalıbına döküldü. Daha sonra kuyucukların oluşması için özel bir tarak takılarak donmaya bırakıldı.

## 4.BULGULAR

Bu çalışmaya 57 mide karsinomlu vaka ve 56 kolon karsinomlu vaka, bunların her ikisi içinde kontrol amaçlı 18'er vaka katılmıştır. Çalışmada hastaların periferal kan örnekleri ve polip doku örnekleri kullanılmıştır.

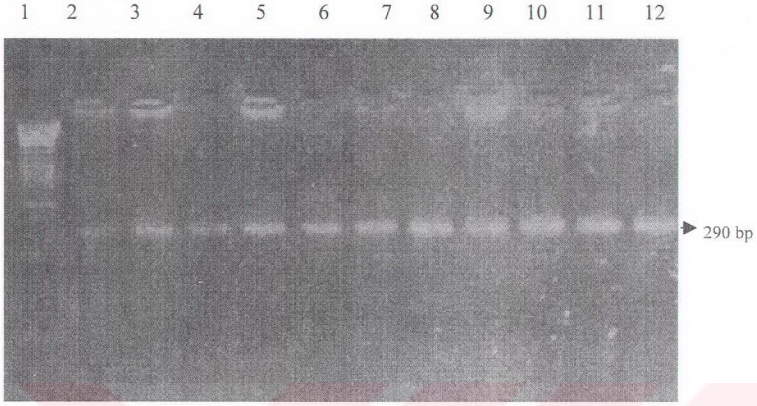
### 4.1. I.PCR BULGULARI

DNA eldesi yapılan çalışma I.PCR işlemine tabi tutuldu. APC geninde I1307K nokta mutasyonunu test etmek için genin 290 baz çifti bölgesi PCR ile çoğaltıldı. PCR işlemi sonrası Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi 290 bp'lik fragmentler tespit edilmiştir.

Bu fragmentlerin çoğaldığı PCR işleminde sonuç taşımayan kuyucukların numaraları alınarak çalışma yeniden ilk aşamada tekrarlanmıştır.

57 mide karsinomlu hastadan ilk aşamada bütün kuyucuklardan pozitif sinyaller alınmıştır. Mide karsinomlu hastalardan alınan örneklerin hepsi periferal kan olduğundan ve DNA elde etme oranı yüksek olduğundan 290 bp'lik fragment çoğaltılması sırasında herhangi bir güçlük yaşanmamıştır.

56 kolon karsinomlu hastadan doku ve periferal kan örnekleri alındı. Kolon karsinomlu hastaların periferal kandan elde edilen DNA'ların PCR işlemi sonrası beklenen şekilde 290 bp'lik bantlar gözlemlendi. Fakat alınan doku örneklerinin hepsinden yeterince verim elde edilememiştir.



**Şekil 4.1.** Birinci PCR işlemi sonrası jel görüntüsü

- 1: Boyut Markırı  
2-12: Hasta Örnekleri

Çalışmaya katılan 56 kolon karsinomlu hastadan 19 tanesinin doku, 37 tanesinin çalışması da periferik kandan elde edilen DNA üzerinden yürütülmüştür.

Bu gruplara kontrol amaçlı kullanılan 36 örneğin çalışması periferik kandan elde edilen DNA üzerinden yürütülmüştür.

#### 4.2. İNKÜBASYON SONRASI BULGULARI

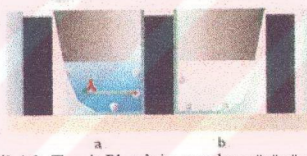
İlk aşamada çalışan PCR ürünleri ile sonraki aşamaya geçilmiştir. Burada her bir test edilecek tüp için bir amplifikasyon sonrası karışımı hazırlanmıştır. Bu tüplere PCR'da 40 dk inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyonun son 10 dk 95°C'de DNA fragmentleri denatüre edildi. İnkübasyon ürünlerinin dayanıklılığı 3-4 saat arasında olduğu görüldüğünden inkübasyonun ardından hemen sonraki basamağa geçildi. Sürenin daha fazla uzamasının PCR'da yapılan inkübasyon ürününün bozulmasına neden olduğu gözlenmiştir. İnkübasyon sonucu çift iplikli DNA'lar denatüre olduğundan bu aşamada tek iplikli DNA elde edildi.



### 4.3. II.PCR BULGULARI

İnkübasyon ürünleri pronto plate adı verilen özel kuyucuklara paylaştırılmıştır. Bu plate'lerde her bir örnek yada katılımcı, için iki adet kuyucuk vardır. Bunlardan biri mutasyon kuyucuğu diğeri de normal alleli (wild tip) tanır. Örneklerin kuyucuğa yerleştirilmesi işlemi çok hassas şekilde yapıldı. Bazı kuyucukların dibinde hava kabarcığı görüldü bunlar kesin olarak giderildi ve çalışma bu şekilde ilerleyebildi. Sonra platelere II.PCR işlemi yapıldı. Platedeki kuyucuklar içerisinde 5' ucu biyotin ile etiketli kısa nükleotit dizileri (primer) yer almaktadır. İnkübasyon ürünü tek iplikli DNA olduğundan biyotinin işaretli nükleotitler kullanılarak komplementer zincir oluşturuldu.

Bu aşamadan sonra yeni bir plate geçildi. Tespit plate adı verilen bu yeni ortam streptavidin ile kaplanmış durumda hazır bulunmaktadır. Bu yeni ortama aktarılan ürünler, primerin 5' antijen kısmına yönelmiş olan hrp-etiketli antipadi tarafından tespit edildi. Bu olay Şekil 4.2'de detection platenin yandan görüntüsünde görülmektedir.

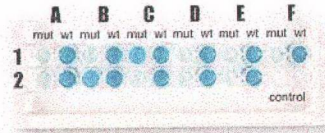


Şekil 4.2. Tespit Plate'nin yandan görünüşü

### 4.4. KOLORİMETRİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

Her örnek için iki kuyucukta değerlendirme yapıldı. İlk (mutasyon) kuyucukunda renk değişimi, ikinci (yabani/normal) kuyucukta renk değişimi veya her iki kuyucukta renk değişimi gözlenebilir durumlar karşımıza çıktı. Renk değişimi spektrofotometrede 620 nm'de ölçülerek tespit edildi.

620 nm dalga boyunda yapılan ölçümler Tablo 4.1 kriter alınarak değerlendirildi.



Şekil 4.3. Substrat ile etkileşmiş Tespit Plate'nin üstten görünüşü

Çalışılan tüm örnekler Tablo 4.1.'e göre değerlendirildi. Buna göre kuyucukların optik dansite (O.D.) değeri 0.5 ve yukarı olanları pozitif, O.D. değeri 0.35 ve aşağısı negatif kabul edilirken 0.35-0.50 arası bulunan değerlerde çalışma en baştan yeniden tekrarlandı.

İlk kuyucuktan yeterli düzeyde OD alınmış ise I1307K homozigot mutant, ikinci kuyucuktan sinyal alınmış ise homozigot normal olarak, her iki kuyucuktan sinyal alınmış ise heterozigot olarak değerlendirildi. Bizim çalışmalarımız sonrasında homozigot mutant genotip elde edilemedi.

**Tablo 4.1.** Genotip belirlemek için kriterler

Mut kuyucuğu OD 620 nm	Wt kuyucuğu OD 620 nm	Mut/wt Oranı	Genotip
< 0.35	> 0.50	< 0.50	Normal
> 0.50	> 0.50	0.5-2.0	Heterozigot
> 0.50	< 0.35	> 2.0	Heterozigot

Şekil 4.3'te APC 3920 T>A (I1307 K) homozigot normal genotip A1, A2, B1, C2, D1, D2, E1, E2, F1 kuyucuklarında detection platedeki renkli görüntüleri görülürken, Tablo 4.2'de bu platenin 620 nm'de spektrofotometrede okunan örnek değerleri görülmektedir.

**Tablo 4.2.** Şekil 4.3'te görülen Tespit Plate'nin 620 nm'de spektrofotometrede ölçüm değerleri

	A		B		C		D		E		F	
	mut	wt	mut	wt	mut	wt	mut	wt	mut	wt	mut	wt
1	0.221	2.158	0.126	2.154	1.604	2.506	0.145	2.471	0.092	2.469	0.075	2.694
2	0.086	1.801	1.535	2.469	0.097	1.702	0.210	2.560	0.149	3.650	0.000 kontrol	0.000 kontrol

57 mide karsinomlu hastaların Tablo 4.1'deki ilk satır değerlere uygun 50 ölçümü bulunmuştur. Yani çalışılan 57 mide karsinomlu hastanın 50'sinde APC 3920 T>A (I1307K) homozigot normal bulunmuştur.

56 kolon karsinomlu hastanın ise 26'sında APC 3920 T>A (I1307K) homozigot normal bulunmuştur.

36 kontrol katılımcının ise tamamında APC 3920 T>A (I1307K) homozigot normal genotipi belirlendi.

Şekil 4.3'te B2,C1'te heterozigot genotipler görülmektedir. Aynı adlı kuyucukların spektrofotometre ölçümleri ise tablo 4.2'de görülmektedir.

Bu duruma göre ise 57 mide karsinomlu hastadan 7'sinde APC 3920 T>A (I1307K) heterozigot genotip,

56 kolon karsinomlu hastanın ise 30'unda APC 3920 T>A (I1307K) heterozigot genotip bulunmuştur. Bütün bu bulgulara göre hasta ve kontrol grupları için gerekli istatistiksel çalışmalar yapıldı ve sonuçlar aşağıda belirtildi.

**Tablo 4.3.** Mide CA hastaları ve kontrol grubu karşılaştırılması.

	APC I1307K				TOPLAM	
	TAŞIMAYAN		TAŞIYICI			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Mide Ca	50	87.7	7	12.3	57	100
Kontrol	18	100			18	100
Toplam	68	90.7	7	9.3	75	100

p> 0.05

Tablo 4.3'te mide karsinomlu 57 hasta ve 18 kontrol grubuna ki-kare testi uygulanarak istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark görülmemiştir (p> 0.05).

**Tablo 4.4.** Kolon CA hastaları ve kontrol grubu karşılaştırılması

	APC I130K				TOPLAM	
	TAŞIMAYAN		TAŞIYICI			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Kolon Ca	26	46.4	30	53.6	56	100
Kontrol	18	100			18	100
Toplam	44	59.4	30	40.5	74	100

p< 0.05

Kolon CA hastaları için; kontrol grubu ve kolon CA hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ( $p < 0.05$ ). Bu nedenle kadınlar ve erkekler arasında da istatistiksel bir fark olup olmadığına bakıldı ve kadınlar için Tablo 4.5, erkekler için Tablo 4.6 ortaya çıktı. Bu iki tabloya göre de  $p < 0.05$  olduğu için hem kadınlar ile kadın kontrol grupları arasında, hem de erkekler ile erkek kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü.

**Tablo 4.5.** Kadın kolon CA hastaları ve kontrol grubu karşılaştırılması.

	KADINLAR				TOPLAM	
	TAŞIMAYAN		TAŞIYICI			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Kolon Ca	11	47.8	12	52.2	23	100
Kontrol	6	100			6	100
Toplam	17	58.6	12	41.4	29	100

$p < 0.05$

**Tablo 4.6.** Erkek kolon CA hastaları ve kontrol grubu karşılaştırılması.

	ERKEKLER				TOPLAM	
	TAŞIMAYAN		TAŞIYICI			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Kolon Ca	15	45.5	18	54.5	33	100
Kontrol	12	100			12	100
Toplam	27	60	18	40	45	100

$P < 0.05$

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

I1307K polimorfizmi nükleotit 3920'deki T'nin A'ya transversiyonudur. Laken ve arkadaşları APC genindeki I1307K polimorfizmin kolon kanseri gelişim riskinin hemen hemen iki kat yatkın olduğunu belirlemişlerdir. Laken ve arkadaşları I1307K allellini sıklıkla kolonik tümörlerde mutasyona uğramış yada kaybolmuş olarak buldu. Mutasyona uğramış allellerin direk olarak tümör genetik prosese katıldığını, indirek olarak ise APC geninin bitişik kısmında mutasyona duyarlı bölge (MCR) oluşturabileceğini açıklamışlardır. Bu allel taşıyıcılarındaki, artan kanserlerde, I1307K mutasyonundan dolayı APC allellere yakın MCR bölgesi sekanslarında mutasyonlara ve delesyonlara yol açabilir. Bunun nedeni, bu polimorfizmin aynı kromozom üzerinde MCR bölgelerindeki delesyonlar boyunca APC allelinin inaktivasyonuna neden olmasıdır. MCR bölgesindeki delesyonlar çeşitlidir. Bazı mutasyonlar MCR bölgesinin tamamının eksikliği bazı mutasyonlar ise sadece bir bölgesinin eksikliğine yol açar (128).

APC geni I1307K polimorfizmindeki mutasyon germline ve sporadik olarak oluşabilir. Çalışmamız sırasında bulunan I1307K mutasyon taşıyıcılık oranı kolon karsinomasında %53.5 (30/56) dir. Oranın bu kadar yüksek olması, APC I1037K nokta mutasyonunun kolon kanser geliştirme riskini iki kat artırıyor olmasından kaynaklanabilir. APC geninde yer alan çeşitli mutasyonların kolon ve mide karsinogenezinde rol

oynayabileceğinin bilinmesinden dolayı çalışmamızda kolon ve mide karsinomasına sahip hastalarda, I1307K mutasyonunun sıklığını araştırmak hedeflenmiştir. Hedefimiz doğrultusunda kan ve doku örneklerinden çalışılmasının nedeni ise; I1307K mutasyonu taşıma şeklini belirlemektir. Yani mutasyonun sporadik veya germline oluşum tipini kan ve doku örneklerinin sonuçlarına göre yorumlayabilmektir. Ayrıca I1307K mutasyon sıklığının Ashkenazi yahudilerinde ırkında yaklaşık %6 olduğundan, Türk toplumu için katılan örneklerdeki sıklığının tespit edilmesi hedeflenmiştir.

56 kolon karsinomalı hastanın 19 tanesinin çalışılan doku örneğini polip dokusu oluşturdu. 19 dokudan ise 12 tanesinde I1307K heterozigot tespit edildi. Heterozigot hastalardaki poliplerin varlığının nedeni söz konusu I1307K mutasyonunun polip oluşturma yeteneğinden kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmüştür. Fakat mutasyon göstermeyen kişilerde polip oluşumunun etiyojisi başka genetik, diyet veya çevresel değişikliklerin olabileceğini düşündürmüştür. Polip oluşumları kolon karsinogenezinin başlangıç aşamasında görüldüğünden, polip taşıyan kişilerin taşıdıkları polip sayısındaki artış ve bunların adenoma ya da malignansiye dönüşmesi ile kolon kanserinin gelişmesi kaçınılmazdır.

I1307K mutasyonunun direk moleküler etkisi APC genindeki kısaltılmış bir protein oluşumu ile sonuçlanan mutasyona sahip 11 hastada, CRC ve I1307K 'lı hastaların 23 arasında Laken ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (1). Mutasyon ani olarak kodon 1307'de oluşmaktadır. DNA replikasyonundaki kayım sürecinde oluşan insersiyon ve delesyonlar, mutasyonlara eğilimli olabilen (A)<sub>3</sub>T(A)<sub>4</sub> sekansının yerine (A)<sub>8</sub> sekansına oluşumundan dolayı olduğu öne sürülmektedir. Bu oluşum I1307K mutasyonu taşıyıcılarında açıklanmış olan, mutasyon farklılıklarının tipini ve yerleşimini bulan ve I1307K taşımayan kişilerin sporadik CRC tümör DNA'larındaki kodon 1307 bölgesini sekans etmiş olan Prior ve arkadaşları tarafından desteklenmiştir. Şu anki kanıtlar, kolorektal karsinogeniste hücre siklusunda düzenleyici rolü olduğu öne sürülen APC proteininin kısaltılmasına yol açan kodon 1307 etrafındaki tek bir baz insersiyonuna ya da delesyonuna hassas olan bölge tarafından oluşturulan I1307K'nın CRC'ye yatkın olduğu hipotezini doğrulamaktadır (129).

Çalışmaya katılan kolon karsinomalı hastaların 37 tanesinin kan örneğinden 18 tanesinde I1307K mutasyonu taşıyıcı bulunması bu kişilerin mutasyonu germline olarak taşıyabileceğini düşündürmüştür. Mutasyon taşıyıcılarında ki diğer bir ihtimal ise

bu mutasyonun bir polimorfizm olmasıdır. 19 kolon karsinomali hastanın incelenen kan örneğinde I1307K mutasyonu tespit edilmemiştir. Bu hastalarda da mutasyon somatik hücrelerde sporadik olarak meydana gelmiş olabileceğini düşündürmüştür. Bu durumda mutasyon bir germline mutasyon olmadığından dolayı kan dokusundan tespit edilememiş olacaktır. Bu şekilde sporadik oluşan mutasyonlar için somatik doku örnekleri numuneleri alınarak aynı gende sonradan kazanılmış bir hasar olup olmadığına bakılmakla sonuç alınabilir.

Sporadik kolon kanser patogenezi içinde çeşitli nedenler vardır; CRC onkogenlerinin mutasyonlarının aktivasyonu, tümör supressör gen aktivasyonu ile oluşur, bir hücrenin somatik mutasyonları malignan transformasyon için gereklidir, mutasyon sekansına daha fazla genetik mutasyonların katılımı tümörlerin biyolojik devresini belirler (130).

I1307K mutasyonunun AJ toplumundaki kolorektal kanser (CRC) ile ilişkisini belirlemek için Laken ve arkadaşları 211 CRC ile etkilenmiş AJ bireylerini inceledi. Bu inceleme sonucunda incelenen 211 CRC'de % 10.4'ünün I1307K mutasyonu içerdiğini buldu. Bu CRC'siz Ashkenazilerde görülenden oldukça büyük bir orana sahip olması bakımından önemlidir. Buna ilave olarak I1307K mutasyonun CRC'li olan 66 yaş üzerindeki kişilerde bulunduğu oran, 66 yaş altındakilere göre daha yüksektir. Laken ve arkadaşları aynı zamanda CRC'li Ashkenazi'lerde oldukça genel olan bu mutasyonun, birinci yada ikinci derecede ilişkili olduğu CRC'lilerde, CRC'li Ashkenazi'deki adenomatöz polip, negatif ailesel tarihli yada her ikisine de sahip Ashkenazi'lerde mutasyonun oldukça genel olduğunu belirledi (% 28) (1).

Genel olarak çalışılan 56 kolon karsinomali hastanın 30 tanesinde heterozigot bulunması yaklaşık %53.5 gibi oldukça yüksek bir oran olarak karşımıza çıkar.

Henry Line ve arkadaşları AJ toplumunda I1307K değişiminin yüksekliği, I1307K'nın AJ'ye özgü olduğunu söylemektedir (129). Bu nedenle 148'i Find, 105'i Afrikan Amerikalı, 54'ü Hawai-Japonu ve 38'i İtalyan olan 392 Jewis dışı Norveçli'de bu değişim araştırılmış ve bulunamamıştır (131). İsrail'de Ashkenazi geçmişi 261 araştırmanın 20'sinde (% 7.7'si) mutasyon gözlemlendi. Bu araştırmalar I1307K sıklığının başlangıçtaki yaklaşımını doğruladı. Ashkenazi dışı İsrail yahudilerinde gen sıklığı %1.3 gibi düşük frekansta bulundu (129).

Bizim çalışmalarımızda %53.5 gibi yüksek taşıma oranı olmasının nedeni, çalışmalarımızda kolon karsinomalı kişileri kullanmış olmamız ve bu rakamın heterozigot genotipi göstermiş olmasından kaynaklanır.

Kalıtsal kolorektal kanserlerin iki tipi bilinir. Bunlardan biri kalıtsal polip taşımayan kolorektal kanser (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: HNPCC) ve ailesel adenomatöz polipozis (Familial Adenomatous Polyposis: FAP)'tır. CRC'nin sebeplerinin % 5'ini bu iki sendrom izah eder. HNPCC'de DNA hasarının tamirini içeren genlerde mutasyon meydana gelir. HNPCC'li hastalarda kolon kanseri genellikle 50 yaş altı gibi erken yaşlarda gelişir. Bunlar kolorektal kanserin güçlü bir ailesel tarihine sahiptir. FAP ise APC'deki inaktive edici mutasyonlarla ilişkilidir (130,131). APC genindeki germsel mutasyonlar nadir olmasına karşılık, gendeki somatik mutasyonlar sporadik CRC'nin % 70'inden fazlasında vardır (2).

FAP'lı hastaların; hastalık fenotipi yalnızca onların germsel APC mutasyonu tarafından belirlenmemiştir. Bazı germsel APC mutasyonu taşıyan insanlar, hastalığın farklı belirtilerine sahip olabilir; bu hastalık fenotipinin çevresel veya diğer genetik faktörlerden de etkileneceğini göstermektedir (132,133).

Mutasyonun fenotip genotip ilişkisi ise şöyledir; Tüm FAP hastalarının bazı gen mutasyonlarına sahip olduğu ve APC geninin mutasyonlarının C-terminal ucu kısaltılmış proteinine yol açtığı bilinmektedir. Buna rağmen tüm FAP hastalarında aynı fenotipik etki görülmez. Bireysel mutasyonlu hastalarda açık olarak farklı klinik özelliklerin gözlenebileceği görülmüştür (133). Gen üzerindeki APC mutasyonlarının lokalizasyonları arasında bazı korelasyonlar ve klinik belirtiler bulunmuştur. Retinal pigment epitelyumunun konjenital hipertrofisi (CHRPE) kodon 463 ve 1387 arasındaki kısaltılmış mutasyonla ilişkilidir (134). Desmoid tümör ve mandibular lezyonlar gibi ekstrakolonik bulguların artışı 1403 ve 1578 kodonlar arasına yerleşmiş olan mutasyonlar ile gözlenmiştir (135). 1250 ve 1464 kodonlar arasındaki bazı mutasyonların kolorektal tümörlerin artan sayısı ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Buna zıt olarak genin 5' ucundaki mutasyonla ilişkili olan FAP zayıf fenotip ile ilişkili bulunmuştur. Genin 3' yarı ucundaki yalnızca birkaç mutasyon tanımlanmıştır ve onlar hafif fenotip belirtisi ile ilişkilidir (136,137). Petrukhin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada I1307K değişiminin göğüs yada ovaryum kanserlerinin ailesel tarihinde bulunmasına dayanarak, Ashkenazi akrabalarında çalışılmış olan CRC ile ilişkili



olmadığı gözlenmiştir (138). Frayling ve arkadaşları çoklu kolorektal adenoma-karsinomlu 164 hastanın germline DNA'sının retrospektif çalışmasında, 1317 pozisyonunda glutamik asit yerine glutaminin, G'nin A'ya değişimi sonucu olduğunu belirledi. Bu mutasyon E1317Q olarak gösterilir ve düşük penetranslı ya da penetranssız düzenli bir missense mutasyon olabilir (139).

APC I1307K mutasyonu diğer APC mutasyonlarından farklılık gösterir. Çünkü mutasyonun kendisi kolon kanserine neden olmaz, bunun yerine kolon kanserine neden olabilecek ilave genetik değişikliklere çok hassas olan, gende stabil olmayan bir bölge (MCR) olarak hareket eder. Bu gen mutasyonlu bireyler çocuklarının her birine gen mutasyonunu %50 geçirme şansına sahiptir. Gen mutasyonunun kalıtsal olmadığı bireyler kendi çocuklarına bunu geçirmezler (123).

Germline mutasyonlar Retinoblastoma 1, P53, NFI, NFII, APC, WII gibi tümör supressör genlerde de gözlenir. Bu genlerdeki somatik mutasyonlarda, sporadik kanser gelişmesine rol açar. Bazı tümör supressör genlerde, mutasyon gerçekleşmeden tümör hücrelerinde alternatif bir epigenetik inaktivasyon mekanizması ile genin susturulduğu ileri sürülmektedir. Bu epigenetik değişiklik; promotor veya promotor bölgesi yakınlarında oluşan normalden farklı bir metilasyon tablosudur. Değişen bu metilasyon durumu kalıcı değişiklik olarak yavru hücrelere aktarılır. Bunun da tümör supressör genin transkripsiyonel baskılanmasında rol oynadığına inanılmaktadır (140). Kolorektal kanser (CRC), kolonun kronik inflamatuvar barsak hastalıklı (IBD) bireylerinde artan bir insidansla oluşur. Bununla beraber Kahl ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda CRC ile ilişkili IBD'nin moleküler patogenezinin diğer kolon kanserlerinden farklı olabileceğini öne sürmektedir. Yapılan bir çalışmada IBD ilişkili CRC'li hastaların %6'sı, spontan CRC'li hastaların % 74'ü ile karşılaştırıldığında APC'nin kısaltıcı bir mutasyona sahip olduğu bulunmuştur (141). Bu bulgular IBD ilişkili CRC'li AJ bireylerinde I1307K mutasyonunun başlangıç mutasyonu oluşturduğunu öne sürmektedir (142).

Kolon karsinomalı APC I1307K mutasyon taşıyıcı bireyler Tablo 4.4'te ki-kare istatistiksel analizinde de görüldüğü gibi kontrol grupları ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Bu da I1307K mutasyon taşıyıcı kişilerin kolon kanser gelişim riskinin mutasyon taşımayanlara göre daha fazla olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamız Gryfe ve arkadaşları ile Rozen ve arkadaşları

tarafından yapılan bir çalışma sonucuyla uygunluk gösterir. Gryfe ve arkadaşları I1307K taşıyıcılarının, taşıyıcı olmayanlara oranla 1.5-2 kat CRC riskine sahip olduğunu açıklamışlardır. Öte yandan Gryfe ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, I1307K mutasyonuna sahip her bir bireyin kolorektal adenomatöz polip sayısındaki artışın kanser gelişimi ile ilişkisini buldu (143). Benzer sonuçlar Frayling ve arkadaşları tarafından da elde edildi (129). APC I1307K varyantlarının prevalansı, göğüs-ovaryum kanseri için risk altındaki Ashkenazi bayanlarında yada ovaryum kanserli Ashkenazi bayanlarında artmamaktadır. Ailesel sporadik kolorektal yada göğüs kanserli Norveç popülasyonu için bir risk faktörüne sahip değildir (144)

Miyashiro ve arkadaşları tümör başlangıcında ve hücre adezyon prosesinde APC geninin rolleri arasında öne sürülen bağlantıları karşılaştırdı. Miyashiro ve arkadaşları spesifik antibadileri kullanarak ışık ve imminoelektron mikroskobu ile normal fare bağırsağındaki  $\alpha$ -katenin ve APC proteinin yerleşimini ve dağılımını inceledi. Bu sonuçlar, onlara APC proteininin barsak epitel hücrelerinin lateral sitoplazmasında yerleştiğini ve kateninin kooperasyonunda fonksiyonu olduğunu gösterdi. Oysa mikrovilli ve apikal sitoplazmadaki APC proteini kateninden bağımsız başka bir fonksiyona daha sahiptir (145).

Çalışmamıza katılan 57 mide karsinomlu hastadan 7 tanesinde I1307K heterozigot (%12,2) bulmamız bize APC I1307K mutasyonunun, mide karsinomasında kolon karsinomu gelişiminde olduğu kadar etkili olmadığını göstermiştir. Tablo 4.3'teki Ki-kare testi istatistiğine göre de APC I1307K mutasyon taşıyıcı bireyler ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). Bunun nedeni mide karsinogenezisinde söz konusu mutasyonun etkili olabileceği fakat birincil derecede önemli olmadığından dolayı olabilir.

Lida ve arkadaşları kolon adenomatöz polipozisinde mide adenomasının doğal tarihini yeniden gözden geçirdi. 26 hastanın 13'ünde mide adenoması buldu (6-8 yıl boyunca). 13 hastanın da 6'sında ilave mide adenoması gelişti. Mide kanserli APC gen defekti Japon taşıyıcılarında malignansinin bu tipinin, sıklığı ile ilişkili olan batı ülkelerinden daha çoktur. Offerhaus ve arkadaşları FAP'lı Japon mide kanserini FAP'lı hastalardaki duodenal kanserlerden daha genel olduğunu ve mide adenomasının FAP'lı Japon hastaların %50'sinde geliştiğini yorumladılar. Oysa Jagelman ve arkadaşları Batıdaki

gen taşıyıcılarında duadenal kanserin mide kanserinden çok daha fazla olduğunu açıkladılar (146).

Eğer bir kişi APC gen mutasyonu için pozitifse o kişinin yaşamında % 10-20 kolorektal kanserin gelişme riski olduğu kabul edilir. APC I1307K test sonucu % 99 güvenilirdir. Bu test yalnızca bir gen testidir, kanserin yada poliplerin varlığını belirtmez (147).

Etnik gruplara, geniş bir spektrumdaki ailesel hastalıklara ilave olarak sporadik mutasyonlu kişilerde de APC I1307K mutasyonu taranmalıdır. Epidemiyolojik ve klinik bilgilerin ilerlemesi tümörgenesisteki bu mutasyonun rolünü açıklamak için yardımcı olacaktır.



## 6. KAYNAKLAR

1. Laken SJ, Petersen GME, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, Hamilton SR et al. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet* 1997; 17: 79- 83
2. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170
3. Nomura A. Stomach cancer epidemiology and prevention 1982; 624– 637
4. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31- 49
5. Stadlander CT, Waterbor JW. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2195- 2208
6. Tahara E, Semba S, Tahara H. Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin Oncol* 1996; 23: 307- 315
7. Chan AO, Luk JM, Hui WM, Lam SK. Molecular biology of gastric carcinoma: from laboratory to bedside. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 150- 160
8. Ochiai A, Hirohashi S. Multiple genetic alterations in gastric cancer. *Gastric Cancer* 1997; 87– 99

9. Solcia E, Fiocca R, Luinetti O, Villani L, Padovan L, Calistri D, Ranzani GN, Chiaravalli A, Capella C. Intestinal and diffuse gastric cancers arise in a different background of *Helicobacter pylori* gastritis through different gene involvement. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 8- 22
10. Kramer BS, Johnson KA. Other gastrointestinal cancers: stomach, liver. *Cancer Prevention and Control* 1995; 673– 694
11. Tahara E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993; 119: 265- 272
12. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, Kodama T, Piatyszek MA, Shay JW, Matsuura Y. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3258- 3262
13. Rugge M, Farinati F, Di Mario F, Baffa R, Valiante F, Cardin F. Gastric epithelial dysplasia: a prospective multicenter follow-up study from the Interdisciplinary Group on Gastric Epithelial Dysplasia Multicenter Study. *Hum Pathol* 1991; 22: 1002-1008
14. Rugge M, Farinati F, Baffa R, Sonogo F, Di Mario F, Leandro G, Valiante F. Gastric epithelial dysplasia in the natural history of gastric cancer: a multicenter prospective follow-up study. Interdisciplinary Group on Gastric Epithelial Dysplasia. *Gastroenterology* 1994; 107: 288- 296
15. Kolodziejczyk P, Yao T, Oya M, Nakamura S, Utsunomiya T, Ishikawa T, Tsuneyoshi M. Long-term follow-up study of patients with gastric adenomas with malignant transformation. An immunohistochemical and histochemical analysis *Cancer* 1994; 74: 2896- 2907
16. Kamiya T, Morishita T, Asakura H, Miura S, Munakata Y, Tsuchiya M. Long-term follow-up study on gastric adenoma and its relation to gastric protruded carcinoma. *Cancer* 1982; 50: 2496- 2503
17. Maesawa C, Tamura G, Suzuki Y, Ogasawara S, Sakata K, Kashiwaba M, Satodate R. The sequential accumulation of genetic alterations characteristic of the colorectal adenoma-carcinoma sequence does not occur between gastric adenoma and adenocarcinoma. *J Pathol* 1995; 176: 249- 258
18. Tamura G, Maesawa C, Suzuki Y, Tamada H, Satoh M, Ogasawara S, Kashiwaba M, Satodate R. Mutations of the APC gene occur during early stages of gastric adenoma development. *Cancer Res* 1994; 54: 1149- 1151

19. Wright PA, Quirke P, Attanoos R, Williams GT. Molecular pathology of gastric carcinoma: progress and prospects. *Hum Patho* 1992; 23: 848– 859
20. Hesketh R. *The Oncogene and Tumour Suppressor Gene Facts Book*. Academic Press, San Diego, CA. 1997
21. Wu MS, Shun CT, Wang HP, Sheu JC, Lee WJ, Wang TH, Lin JT. Genetic alterations in gastric cancer: relation to histological subtypes, tumor stage, and *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1997; 112: 1457– 1465
22. Tahara E. Molecular biology of gastric cancer. *World J Surg* 1995; 19: 484– 488
23. Hattori Y, Odagiri H, Nakatani H, Miyagawa K, Naito K, Sakamoto H, Katoh O.K-sam, an Amplified Gene in Stomach Cancer, is a Member of the Heparin- Binding Growth Factor Receptor Genes *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 ; 87: 5983– 5987S
24. Kitaeva MN, Grogan L, Williams JP, Dimond E, Nakahara K, Hauser P, DeNobile JW, Soballe PW, Kirsch IR. Mutations in  $\beta$ -catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 4478-4481
25. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735- 6740
26. Değerli Ü. Kolon hastalıkları, anatomi, fizyoloji. *Cerrahi Gastroenteroji* 1989; 227-229
27. Thomas WP, Robert BC, Audrey CP et al. The I1307K polymorphism of the APC gene in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1999; 116: 58- 63
28. Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC): the syndrome, the genes, and an historical perspective. *J Nat Cancer Inst* 1995; 87: 114- 112
29. Paula M, Calvert MD and Harold Frucht MD. The Genetics of Colorectal Cancer. *Ann Intern Med* 2002; 137: 603-612
30. Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A, Bicknell D, Bodmer WF, Tomlinson IP. APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 28: 3352-3357
31. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor- suppressör P53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3158- 3168

32. Kressner U, Inganas M, Byding S, Blikstad I et al. Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 593- 599
33. Başaran N. *Tıbbi genetik ders kitabı. Güneş & Nobel kitap evi* 1999; 373- 384
34. Capon DJ, Seeburg PH, McGrath JP, Hayflick JS, Edman U, Levinson AD et al. Activation of Ki-ras 2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature* 1983; 304: 507– 513
35. Hall A. A biochemical function for ras - at last. *Science* 1994; 264: 1413- 1414
36. De Vos AM, Tong I, Milburn MV et al. Three dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c- H- ras p21. *Science* 1988; 239: 888- 893
37. Burner GC, Loeb LA. Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2403- 2407
38. Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S, Swalsky PA. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1993; 71: 3827- 3838
39. Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC et al. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J Natl Cancer Inst* 1993; 84: 2004- 2007
40. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1993; 256: 102- 106
41. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525- 532
42. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359: 235- 237
43. Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* 1994b; 54: 5523- 5526
44. Minemoto T, Sawaguchi K, Mai M et al. Infrequent K-ras activation in superficial type (flat) colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Cancer Res* 1994; 54: 2841- 2844
45. Ando M, Maruyama M, Oto M et al. Higher frequency of point mutations in the c-Ki-ras2 gene in human colorectal adenomas with severe atypia than in carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 245- 249
46. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KWF. Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma. *Jama* 1989; 261: 3099- 3103

47. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 207- 210
48. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hylind LM, Celano P, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med.* 1993; 328: 1313- 1336
49. Hill MJ, Drasar BS, Williams RE, Meade TW, Cox AG, Simpson JE, et al. Faecal bile-acids and clostridia in patients with cancer of the large bowel. *Lancet* 1975; 1: 535- 539
50. Frucht H, Gazdar AF, Park JA, Oie H, Jensen RT. Characterization of functional receptors for gastrointestinal hormones on human colon cancer cells. *Cancer Res.* 1992; 52: 1114- 1122
51. Yang WL, Frucht H. Cholinergic receptor up-regulates COX-2 expression and prostaglandin E(2) production in colon cancer cells. *Carcinogenesis.* 2000; 21: 1789- 1793
52. Cheng K, Chen Y, Zimniak P, Raufman JP, Xio Y, Frucht H. Functional interaction of lithocholic acid conjugates with M<sub>3</sub> muscarinic receptors on a colon cancer cell line. *Biochem Biophys Acta.* 2002
53. Reddy BS, Wynder EL. Metabolic epidemiology of colon cancer. Fecal bile acids and neutral sterols in colon cancer patients and patients with adenomatous polyps. *Cancer.* 1977; 39: 2533- 2539
54. Frazier ML, Su LK, Amos CI, Lynch PM. Current applications of genetic technology in predisposition testing and microsatellite instability. *J Clin Oncol* 2000; 18: 70-74
55. Lynch HT, Krush AJ. Cancer family 'G' revisited. *Cancer* 1971; 27: 1505-1511
56. Bertario L, Russo A, Sala P, Varesco L, Giarola M, Mondini P, Pierotti M, Spinelli P, Radice P. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 1698- 1707
57. Heighway J, Hoban PR, Wyllie AH. Sspl polymorphism in sequence encoding 3' untranslated region of the APC gene. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 6966
58. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ et al. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 329: 1982- 1987
59. Boland CR, Kim YS. Gastrointestinal polyposis syndromes. *Gastrointestinal Diseases.* 5th Ed. WB Saunders. 1993; 1430-1448



60. Nagase H, Miyoshi Y, Horii A et al. Correlation between the location of germline mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1992; 52: 4055- 4057
61. Olschwang S, Tiret A, Laurent- Puig P et al. Restriction of ocular fundus lesions to a specific subgroup of APC mutations in adenomatous polyposis coli patients. *Cell* 1993; 75: 959- 968
62. Leppert M, Burt R, Hughes JP, Samowitz W, Nakamura Y, Woodward S, Gardner E . Genetic analysis of an inherited predisposition to colon. *N Engl J Med* 1990; 322: 904- 908
63. Scartozzi M, Bianchi F, Rosati S, Galizia E, Antolini A, Loretelli C, Piga A, Bearzi I, Cellerino R, Porfiri E. Mutations of hMLH1 and hMSH2 in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: correlation with microsatellite instability and abnormalities of mismatch repair protein expression. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 1203-1208
64. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36: 801- 818
65. Watson P, Lynch HT. The tumor spectrum in HNPCC. *Anticancer Res* 1994; 14: 1635- 1639
66. Mentec. Kolon Tümörleri. *Klinik Gastroenteroloji* 4. baskı .384-395
67. Appel MF, Spjut HJ, Estroda RG. The significance of villous component in colonic polyps. *Am J Surg* 1977; 134: 770
68. Muto T, Bussey HJR, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975; 36: 2251
69. Mc Sermott FT, Hughes ESR, Pihl E, Milne BJ, Price AB. Prognosis in relation to symptom duration in colon cancer. *Brj Surg* 1981; 13: 846
70. Grossman S, Milos ML, Tekawa IS et al. Colonoscopic screening for persons with suspected risk factor for colon cancer. II. Past history of colorectal neoplasms. *Gastroenterology* 1989; 96: 299- 306
71. Steven H, Young S. Colonic polyps and polyposis syndromes. Chapter 113 1998; 1865
72. Peter R, Hawley C. Cancer of the colon. *Abdominal operations seventh edition.*2067
73. Öztürk M. Kötü haber genlerde saklı 'Kanser'. *Bilkent Üniv. Moleküler biyoloji bölümü*1-13

74. Weinberg RA. Triangle. Sandoz journal of medical science. Tumor suppressor genes and cancer pathogenesis. *Biology of Cancer*. Cambridge USA 1991; 30
75. Ranson JHC, Rifkind KM, Roses DF. Y col: Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 1974; 139: 69- 81
76. Beroud, C. and Soussi, T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 121– 124
77. Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, and Bodmer WF. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 1992; 340: 626– 630
78. Nagase H and Nakamura Y. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum Mutat* 1993; 2: 425– 434
79. Laken SJ. Analysis of masked mutations in familial adenomatous polyposis. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2322– 2326
80. Miyoshi Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 229– 233
81. Lamlum H. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nature Med* 1999; 5: 1071– 1075
82. Solomon E. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* 1987; 328: 616– 619
83. Lambertz S and Ballhausen WG. Identification of an alternative 5' untranslated region of the adenomatous polyposis coli gene. *Hum Genet* 1993; 90: 650– 652
84. Laird PW. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 1995; 81: 197– 205
85. Esteller M. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4366– 4371
86. Tsuchiya T. Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia. *Oncogene* 2000; 19: 3642– 3646
87. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet*. 2001; 10: 721- 733
88. Kobayashi M. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 82: 1689– 1693

89. Miller JR, Hocking AM, Brown JD and Moon RT. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways. *Oncogene* 1999; 18: 7860–7872
90. Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 273–282
91. Roose J and Clevers H. TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1424: 23–37
92. Korinek V. Constitutive transcriptional activation by a betacatenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma. *Science* 1997; 275: 1784–1787
93. Behrens J. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996; 382: 638–642
94. Mann B. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1603–1608
95. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Munemitsu S and Polakis P. Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res* 1997; 57: 4624–4630
96. Morin PJ. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275: 1787–1790
97. Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B and Polakis P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3046–3050
98. Yost C. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 1996; 10: 1443–1454
99. Pai LM, Orsulic S, Bejsovec A and Peifer M. Negative regulation of Armadillo, a W108 Kobayashi, M. et al. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 82: 1689–1693
100. Munemitsu S, Albert I, Rubinfeld B and Polakis P. Deletion of an amino-terminal sequence beta-catenin *in vivo* and promotes hyperphosphorylation of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4088–4094
101. Hecht A, Litterst CM, Huber O and Kemler R. Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein *in vitro*. *J Biol Chem* 1999; 274: 18017–18024

102. He TC. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281: 1509–1512
103. Shtutman M. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5522– 5527
104. Tetsu O and Mc Cormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398: 422– 426
105. Spirio L, Otterud B, Stauffer D et al. Linkage of a variant or attenuated form of adenomatous polyposis coli to the adenomatous polyposis coli (APC) locus. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 92-100
106. Neufeld KL and White RL. Nuclear and cytoplasmic localizations of the adenomatous polyposis coli protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3034– 3039
107. Wong MH, Hermiston ML, Syder AJ and Gordon JI. Forced expression of the tumor suppressor adenomatous polyposis coli protein induces disordered cell migration in the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9588– 9593
108. Efstathiou JA. Intestinal trefoil factor controls the expression of the adenomatous polyposis coli-catenin and the E-cadherin-catenin complexes in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1998; 95: 3122– 3127
109. Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nature Cell Biol* 2000; 2: 653– 660
110. Zhang F, White RL and Neufeld KL. Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; 97: 12577– 12582
111. Fagotto F, Gluck U and Gumbiner BM. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr. Biol* 1998; 8: 181- 190
112. Smits R. Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes Dev* 1999; 13: 1309– 1321
113. Smith KJ. The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2846– 2850
114. Midgley CA. APC expression in normal human tissues. *J Pathol* 1997; 181: 426– 433

115. Hague A, Hicks DJ, Bracey TS and Paraskeva C. Cell-cell contact and specific cytokines inhibit apoptosis of colonic epithelial cells: growth factors protect against c-myc-independent apoptosis. *Br J Cancer* 1997; 75: 960– 968
116. Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7950– 7954
117. Goss KH and Groden J. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1967– 1979
118. Pignatelli M and Bodmer WF. Integrin cell adhesion molecules and colorectal cancer. *J Pathol* 1990; 162: 95– 97
119. Park CC, Bissell MJ and Barcellos-Hoff MH. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med* 2000; 6: 324– 329
120. Lynch HT, Smyrk TC. Classification of familial adenomatous polyposis: a diagnostic nightmare. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1288- 1289
121. Lynch HT, Smyrk T, Lynch J, Lanspa S, McGinn T, Cavalieri RJ. Genetic counseling in an extended attenuated familial adenomatous polyposis kindred. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 455- 459
122. Brensinger JD, Laken SJ, Luce MC, et al. Variable phenotype of familial adenomatous polyposis in pedigrees with 3' mutation in the APC gene. *Gut* 1998; 43: 548- 552
123. Deborah A, Judith A, Bacon, B.S, Susanl B, Jill D, Constance A.G. The Johns Hopkins Guide for patients and families: APC I1307K gene mutations The Johns Hopkins Hereditary Colorectal Cancer Program in 1998
124. Rozen P, Shomrat R, Strul H, et al. Prevalence of the I1307K APC gene variant in Israeli Jews of differing ethnic origin and risk for colorectal cancer. *Gastroenterology* 1999; 116: 54-57
125. Nyström-Lahti M, Kristo P, Nicolaides NC, et al. Founding mutations and Alu-mediated recombination in hereditary colon cancer. *Nat Med* 1995; 1: 1203- 1206
126. Vogelstein B, Kinzler KW, eds. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill, 1998.
127. Williams C, Weber L, Williamson R&Hjelm M. Guhrle spots for DNA-based carrier testing in cystic fibrosis. *The Lancet* 1988; 693
128. Stern H.S, Viertelhausen S, Hunter, A.G, et al. APC I1307K increases risk of transition from polyp to colorectal carcinoma in Ashkenazi. *Gastroenterology* 2001; 120 : 392- 400

129. Henry T Lynch, Albert de la Chapelle. Genetic susceptibility non-polyposis colorectal cancer. *Med Genet* 1999; 36: 801- 818
130. Kinzler KW, Nilbert Mc, Su LK, Vogelstein B. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; 253: 661- 665
131. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlos M, Gelbert L. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; 66: 589- 600
132. Giardiello FM, Krush AJ, Petersen GM, Booker SV, Kern M, Tong LL, Hamilton SR. Phenotypic variability of familial adenomatous polyposis in 11 unrelated families with identical APC gene mutation. *Gastroenterology* 1994; 106: 1542- 1547
133. Soviria C, Berk T, Madlensky L, Mitri A, Cheng H, Gallinger S, Cohen Z, Bapat B. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1290- 1301
134. Caspari R, Olschwang S, Friedl W, Mandl M, Boisson C, Boker T, Augustin A, Kadmon M, Moslein G, Thomas G. Familial adenomatous polyposis: desmoid tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 337- 340
135. Davies DR, Armstrong JG, Thakker N, Horner K, Guy SP, Clancy T, Sloan P, Blair V, Dodd C, Warnes TW, et al. Severe Gardner syndrome in families with mutations restricted to a specific region of the APC gene. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1151-1158
136. Spirio L, Olschwang S, Groden J et al. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial poliposis. *Cell* 1993; 75: 951- 957
137. Scott RJ, Froggatt NJ, Trembath RC, Evans DG, Hodgson SV, Maher ER. Familial infiltrative fibromatosis (desmoid tumours) caused by a recurrent 3' APC gene mutation. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1921- 1924
138. Petrunikhin L, Dangel L, Vanderveer L et al. The I1307K APC mutations does not predispose to colorectal cancer in Jewish Ashkenazi breast and breast- ovarian cancer kindres. *Cancer Res* 1997; 57: 5480- 5484
139. White S, Rubb VJ, Whllie AH. Germline APC mutation in (Glu) in a cancer-prone family that does not result in familial adenomatous polyposis. *Genes Chrom Cancer* 1996; 15: 122- 128
140. Collins N, Wooster R and Stratton MR. Absence of methylation of CpG dinucleotides within the promoter of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 in normal tissues and in breast and ovarion cancers. *British Journal of cancer.* 1997: 76: 1150-1156

141. Fogt F, Vortmeyer AO, Goldman H, Giardiello TJ. Comparison of genetic alterations in colonic adenoma and ulcerative colitis-associated dysplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 1998; 29: 131- 136
142. Silverberg M, Celland C, Murphy J, Steinhard H. Carrier rate of APC I1307K is not increased in inflammatory bowel disease patients of Ashkenazi Jewish origin. *Hum Genet* 2001; 108: 205- 210
143. Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T et al. Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1998; 153: 1063- 1078
144. Klaus-Peter J, Fatima M, Daniel P, Xavier S, Dany R, Coralie F. Small cancer risk may be associated with alteration in APC gene. *National Cancer Institute Gastroenterology* 2002; 123: 492-504
145. Nakayama T, Morishita T, Komiya T. Adenomatous polyposis coli gene as a gatekeeper. *Gastroenterologia* 2002; 73: 450-454
146. Abraham SC, Nobukawa B, Giardiello FM, Hamilton SR, Wu T. Sporadic Fundic Gland Polyps. *Am J Pathol* 2001; 158: 1005-1010
147. Iida M, Yao T, Itoh H, Watanabe H, Kohrogi N, Shigematsu A, Iwashita A, Fujishima M: Natural history of fundic gland polyposis in patients with familial adenomatosis coli/Gardner's syndrome. *Gastroenterology* 1985; 89:1021-1025

## ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Aydın/Nazilli’de doğdu. İlk, Orta ve Lise öğrenimini Kayseri’de tamamladı. 1996 yılında Erciyes Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 2000 yılında aynı bölümden mezun oldu. Aynı yıl Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji A.B.D.’da yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen aynı bölümde öğrencidir.

Adres: Yeni Mah. 12. Cad. Işık Apt.

No: 88/5

Kocasinan/ KAYSERİ

E-Mail: hkaraca2001@yahoo.com