

KOLOREKTAL KARSİNOMA TANISI ALAN HASTALARDA KRAS, BRAF
ONKOGEN YAPISAL MUTASYONLARI VE BAZI TÜMÖR SÜPRESÖR
GENLERİN (HIC1, p16, DAPK1, SFRP2, MGMT) DOKUYA ÖZGÜ METİLASYON
PROFİLLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

BİNNUR KÖKSAL

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2011

T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLOREKTAL KARSİNOMA TANISI ALAN HASTALARDA KRAS, BRAF ONKOGEN
YAPISAL MUTASYONLARI VE BAZI TÜMÖR SÜPRESÖR GENLERİN (HIC1, p16, DAPK1,
SFRP2, MGMT) DOKUYA ÖZGÜ METİLASYON PROFİLLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

BİNNUR KÖKSAL

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. MUSA SARI

SİVAS
2011

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 9 sayılı toplantısında kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

Bu alışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve Jürimiz tarafından BİYOLOJİ Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Davut ALPTEKİN

Üye: Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR

Üye: Doç. Dr. şifa TÜRKOĞLU

Üye: Yrd. Doç Dr. şeker DAĞ

Üye (Danışman): Yrd. Doç Dr. Musa SARI

ONAY

Bu tez çalışması 08.07.2011 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖZET

KOLOREKTAL KARSİNOMA TANISI ALAN HASTLARDA KRAS, BRAF ONKOGEN YAPISAL MUTASYONLARI VE BAZI TÜMÖR SÜPRESÖR (HIC-1, P16, DAPK1, SFRP2 ve MGMT) GENLERİN DOKUYA ÖZGÜ METİLASYON PROFİLLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Binnur KÖKSAL

Doktora tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Musa SARI

2011, 96 sayfa

Kanser genomda meydana gelen genetik ve epigenetik değişimlerin neden olduğu kontrolsüz hücre bölünmesidir. Kolorektal kanser dünya genelinde hem kadın hem de erkeklerde 3. en sık kanser türüdür. Bu güne kadar kolorektal kanser genetiği ile ilgili pek çok onkogen mutasyonu ve tümör süpresör gen hipermetilasyonu değerlendirilmiş ve kolorektal kanser oluşumundaki yerleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu tez kapsamında kolorektal kanser dokularında KRAS ve BRAF onkogen mutasyon sıklıkları, HIC1, SFRP2, P16, DAPK1 ve MGMT tümör süpresör genlerinin promotör hipermetilasyon profilleri ve bu genlerdeki hipermetilasyonların onkogen mutasyonları ile olası ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla çalışmaya 93 adet kolorektal kanser dokusu (32 kadın, 61 erkek; ortalama yaş 65.59 ± 14.19) ve 14 adet (5 kadın, 9 erkek; ortalama yaş $63,89 \pm 5.9$) kolorektal kanserli bireylere ait normal kolon mukozası dahil edilmiştir. Dokulardan izole edilen genomik DNA'larda 12 adet KRAS mutasyonu (kodon 12Val, kodon 12Asp, kodon 12Leu, kodon 12Ser, kodon 12Ala, kodon 12 Ile, kodon 12Cys, kodon 12Arg, kodon 13Cys, kodon 13Asp) revers-hibridizasyon strip test yöntemi ile araştırılmıştır. BRAF V600E mutasyonu restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Tümör süpresör genler DNA'nın bisülfid modifikasyonunun ardından metil spesifik PCR (MSP) ile amlifiye edilmiş ve revers-hibridizasyon strip test tekniği ile promotör hipermetilasyon profilleri belirlenmiştir.

Yapılan deneyler sonrasında hasta grubunda KRAS mutasyon frekansı % 54.84 (n=51), BRAF mutasyon frekansı % 12.9 (n=12) olarak saptandı. SFRP2, DAPK1, MGMT, HIC1 ve p16 genlerinin promotör hipermetilasyon frekansları sırası ile % 66.7, % 45.2, % 40.9, %40.9, % 15.1 olarak belirlendi. KRAS gen mutasyonu ve tümör süpresör gen promotör hipermetilasyon birliktelikleri istatistiksel olarak anlam ifade etmezken, BRAF V600E mutasyonları ile hipermetile SFRP2 (p=0.005) ve hipermetile p16 genlerinin (p=0.016) birlikte bulunmalarının anlamlı derecede sık olduğu saptandı.

Sonuç olarak; bu araştırmadan elde edilen bulgular ışığında KRAS mutasyonu ve SFRP2 hipermetilasyonu kolorektal kanser onkogeninde önemli rol oynamaktadır. BRAF V600E mutasyonu tümör süpresör gen hipermetilasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Genetik ve epigenetik analizler tüm kanser türleri için kanser başlaması, seyri ve tedavi yöntemlerinin seçimi için belirleyici rol üstlenmektedirler.

Anahtar Kelimeler: KRAS geni, BRAF geni, tümör süpresör gen, HIC1, SRFP2, p16, DAPK1, MGMT, kolorektal kanser.

SUMMARY

COMPARISON OF KRAS, BRAF ONCOGENE MUTATIONS AND TISSUE SPECIFIC PROMOTER HYPERMETHYLATION OF SOME TUMOR SUPPRESSOR GENES (HIC-1, P16, DAPK1, SFRP2 and MGMT)

Binnur KÖKSAL

Doctor of Philosophy Thesis, Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Musa SARI

2011, 96 pages

Cancer is uncontrolled cell proliferation which is caused by genetic and epigenetic alterations occurred in genome. Colorectal cancer is third frequent cancer in both woman and man worldwide. Until today a lot of oncogene mutations and tumor suppressor genes promoter hypermethylation were evaluated and the roles of these genes in colorectal carcinogenesis were tried to determine. Within the context of current thesis, frequencies of oncogen KRAS and BRAF mutations, promoter hypermethylation profiles of tumor suppressor genes HIC1, SFRP2, P16, DAPK1 and MGMT and possible associations between hypermethylations of these genes and KRAS and BRAF mutations were aimed to find out.

For this purpose 93 colorectal cancer tissue (32 woman, 61 man; mean age: 65.59 ± 14.19) and 14 normal colon mucosa which belong to colorectal cancer patients were included in the study. In the isolated genomic DNA, twelve KRAS gene mutation (codon 12Val, codon 12Asp, codon 12Leu, codon 12Ser, codon 12Ala, codon 12Ile, codon 12Cys, codon 12Arg, codon 13Cys, codon 13Asp) were investigated with using reverse-hybridisation strip assay method. BRAF V600E mutations were investigated with using restriction fragment length polymorphism (RFLP). Tumor suppressor genes were amplified with MSP after bi-sulphide modification of DNA and by using reverse-hybridisation strip assay method, tumor suppressor gene promoter hypermethylation profiles of five genes were determined.

In the patient group KRAS and BRAF frequency mutation were determined as 54.84% (n=51) and 12.9% (n=12) respectively. Promoter hypermethylation frequencies of tumor suppressor genes SFRP2, DAPK1, MGMT, HIC1 and p16 were determined as 66.7%, 45.2%, 40.9%, 40.9 %, 15.1% respectively. No statistically significant

associations were found between KRAS gene mutation and tumor suppressor gene hypermethylation. Statistically significant associations were found between BRAF gene mutations and SFRP2 and p16 tumor suppressor gene hypermethylation ($p=0.005$ for SFRP2 and $p=0.016$ for p16).

As a result in the lighth of the findings which are obtained from this study, KRAS mutations and SFRP2 tumor suppressor gene promoter hypermethylations play important role in colorectal cancer oncogenesis. BRAF V600E mutation was found to be related with tumor suppressor gene hypermethylation. Genetic and epigenetic analyses have determining role for all cancer types in the oncogenesis, prognosis and selection of treatment regimens.

Key words: KRAS gene, BRAF gene, tumor suppressor gene, HIC1, SRFP2, p16, DAPK1, MGMT, colorectal cancer.

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Musa SARI'ya tez boyunca yaptığı katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Çalışmanın planlanması ve deneylerin yapımı boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR'e müteşekkirim.

Tezin laboratuvar çalışmaları aşamasında imkan sağlayan Prof. Dr. İlhan SEZGİN'e ve dokuların temini için yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Kürşat KARADAYI'ya ve tez önerimi ve laboratuvar çalışmalarının değerlendirilmesi aşamasında desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e teşekkür ederim.

Her konuda beni sabırla destekleyen aileme desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	İ
SUMMARY.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	İX
TABLolar DİZİNİ.....	Xİİ
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ.....	Xİİİ
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kolorektal Kanser.....	3
2.1.1. Kolorektal Kanser Etiyolojisi.....	5
2.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri ve Kanser Genetiği.....	6
2.2.1. Onkogenler.....	7
2.2.2. Tümör Süpresör genler.....	8
2.3. Tez Kapsamında Çalışılan Onkogenler.....	8
2.3.1. KRAS geni.....	8
2.3.1.1. MAPK Sinyal iletim yolağı ve KRAS ve BRAF.....	8
2.3.1.2.PI3K Sinyal İletim Yolağı.....	9
2.3.1.3.KRAS Geni ve Aktivasyonu.....	10
2.3.2. BRAF Geni.....	11
2.4. Epigenetik ve Kanser.....	13
2.4.1. DNA Metilasyonu.....	13
2.4.2. DNA Metilasyonu ve Kanser.....	15
2.4.3. DNA Metilasyonunun Mutajenik Etkisi.....	16
2.4.4. DNA Metilasyonunun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	17
2.4.4.1.Bisülfid Modifikasyonu Temelli Metodlar.....	17
2.4.4.1.1. Bisülfid Modifikasyonu.....	17
2.4.4.2.Restriksiyon Enzim Temelli Metodlar.....	17
2.4.4.3.Metile DNA'ya Bağlanan Bir Protein Alt Birim Kullanılarak Metile DNA Fragmentlerinin Alıkonmasına Dayanan metodlar.....	18
2.5. Tez Kapsamında Promotör Hipermetilasyonu Araştırılan Tümör Süpresör Genler.....	18
2.5.1. MGMT.....	18

2.5.2.	HIC1.....	21
2.5.2.1.	Kanserlerde HIC1 İnaktivasyonu.....	22
2.5.3.	DAPK1.....	22
2.5.3.1.	DAPK1'in Görevleri.....	24
2.5.3.1.1.	DAPK1 ve Apoptoz.....	24
2.5.3.1.2.	DAPK1 ve Otofaji.....	25
2.5.4.	SFRP2.....	25
2.5.4.1.	Wnt Sinyal İletim Yolağı.....	26
2.5.4.2.	Wnt Sinyal İletim Yolağı Elemanları.....	27
2.5.4.2.1.	Wnt Ligant ve Reseptörleri.....	27
2.5.4.2.1.1.	Wnt Ligantları.....	27
2.5.4.2.1.2.	Wnt Reseptörleri.....	27
2.5.4.2.2.	Downstream Reseptör Kompleksi.....	28
2.5.4.2.3.	Multiprotein Kompleksi.....	28
2.5.4.2.4.	Nükleer Bileşenler.....	28
2.5.4.2.5.	Hücre Dışı Wnt İnhibitörleri.....	29
2.5.4.2.5.1.	SFRP Ailesi.....	30
2.5.5.	p16 ^{INK4a} Geni.....	31
3.	MATERYAL ve METOD.....	33
3.1.	Hasta Grubu.....	33
3.2.	Tümör Dokularından Genomik DNA izolasyonu.....	33
3.3.	Parafin Bloklardan DNA İzolasyonu.....	35
3.4.	KRAS Mutasyon Analizi.....	35
3.4.1.	Agaroz jel elektroforezi.....	36
3.5.	BRAF V600E Mutasyon Analizi.....	36
3.5.1.	BRAF Geni Amplifikasyonu.....	37
3.5.2.	Restriksiyon Kesim.....	37
3.6.	Tümör Süpresör Gen Promotör Hipermetilasyon Analizi.....	38
3.6.1.	DNA'nın Bisülfid ile modifikasyonu ve Saflaştırılması.....	38
3.6.2.	MSP ile MGMT, HIC1, DAPK1, SFRP2 ve P16 Genlerinin Amplifikasyonu.....	40
3.7.	KRAS Mutasyonları ve Tümör Süpresör hipermetilasyonlarının Revers Hibridizasyon Yöntemi ile Değerlendirilmesi.....	40
3.7.1.	Revers Hibridizasyon basamakları ve Kullanılan Solüsyonlar.....	40

3.7.1.1.Strip Üzerindeki Problar ve PCR Ürünlerinin Bağlanması, Hibridizasyon.....	40
3.7.1.2.Yıkama.....	40
3.7.1.3.Renk Oluşumu.....	41
3.8. Sitriplerin Değerlendirilmesi.....	41
3.9. İstatistik.....	41
4. BULGULAR.....	44
4.1. Çalışma Grubuna Ait Demografik Bulgular.....	44
4.1.1. Hasta Yaş ve Cinsiyet Dağılımları.....	44
4.1.2. Çalışma grubunda bildirilen kolorektal kanser bölgeleri ve histolojik tip dağılımları.....	45
4.2. Çalışma Grubunda Saptanan Mutant KRAS Geni Frekansı.....	46
4.2.1. Saptanan KRAS Mutasyonlarının Dağılımları.....	46
4.2.2. KRAS Geninde Saptanan G>A Transisyon Mutasyonu Frekansı.....	49
4.2.3. KRAS geni mutasyonları ile MGMT Hipermetilasyonunun Karşılaştırılması.....	50
4.3. Çalışma Grubunda Saptanan BRAF Mutasyon Frekansı.....	50
4.4. Çalışılan Tümör Süpresör Genlerin Hipermetilasyon Frekansları.....	51
4.5. Hasta Grubunda KRAS Mutasyonu Varlığı ile Tümör Süpresör Gen Hipermetilasyonu Birliktelikleri.....	54
4.6. Hasta Grubunda BRAF Mutasyonu Varlığı ile Tümör Süpresör Gen Hipermetilasyonu Birliktelikleri.....	55
4.7. Kolorektal Kanser Tanısı Almış Hastaların Normal Kolon Mukoza Örneklerinin Mutasyon ve Hipermetilasyon Frekansları.....	56
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	57
6. KAYNAKLAR.....	69
7. ÖZGEÇMİŞ.....	95
8. EKLER	96

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1** RAS/MAPK sinyal iletim yolağı (Garnett ve Marais, 2004).....9
- Şekil 2.2** KRAS'ın aktivasyonu a. Ekstrasellüler sinyal varlığında GEF RAS'a bir guanin bağlayarak aktive olmasını sağlar b. Sinyalin olmaması durumunda GAP'ı GTP hidrolizi için stimüle eder. GDP'ye bağlı ras inaktif haldedir. c. Mutant RAS GAP'a duyarsızlaşır ve ekstrasellüler sinyalden bağımsız halde sürekli aktif formda kalır.....10
- Şekil 2.3** BRAF proteininin şematik gösterimi. Şemada RAF proteinlerinin korunmuş 3 alt birimi CR1, CR2 ve CR3 görülmektedir. CR3 alt birimi kinaz aktivitesine sahiptir. ARAF, BRAF ve CRAF için N bölgesi, aktivasyon segmenti glisince zengin bölge ve katalitik bölge oklarla gösterilmiştir. Aminoasit dizileri üzerindeki sarı işaretlemeler kinaz aktivitesi için gerekli fosforilasyon bölgelerini göstermektedir. Kanser ile ilişkili BRAF mutasyonları koyu renkle simgelenmiş ve değişen amino asitler dizi üzerinde gösterilmiştir. Mutant amino asitler aktive edici mutasyonlar için yeşil, BRAF kinaz aktivitesini bozanlar için kırmızı ve etkisi bilinmeyen mutasyonlar için mavi renkte gösterilmiştir. ARAF, BRAF ve CRAF için korunmuş aminoasitler nokta ile gösterilmiştir (Garnett ve Marais, 2004)...12
- Şekil 2.4** 5- metilsitozinin DNA metiltransferazlarca oluşturulması. S-CH₃, SAM'in S- metil grubunu simgelemektedir (Friso ve Choi, 2009).....14
- Şekil 2.5** Gen ekspresyonunun epigenetik olarak baskılanması. DNA metiltransferazlar CpG dinükleotidlerinin metillenmesini sağlar. Bu bölgelere Metil bağlayıcı protein ve Histon deasetilazlar bağlanarak transkripsiyon faktörlerinin bu bölgelere bağlanmasını engeller ve transkripsiyonu baskılar. Bu durum histon deasetilasyonu ve kromatin kondensasyonu ile sonuçlanır. (Manoharan ve ark, 2007'den).....15
- Şekil 2.6** DNA metilasyonunun mutajenik etkisi. a- 5-metil sitozinin spontane deaminasyon ile timine dönüşümü. b- Sitozinin enzim aracılıklı urasile deaminasyonu (Gonzalzo ve Jones, 1997'den).16
- Şekil 2.7** MGMT geninin aktif olduğu durumda promutajenik oluşumları engellemesi (solda) ve alkilleyici ajanları uzaklaştıramadığı hipermetile durumda G:A transisyonunun oluşumu.....19
- Şekil 2.8** DNA'daki metile bazların tamiri. Basit metilleyici ajanlara maruz kalma çift zincirli DNA'da O⁶-metilguanin (O⁶meG) ve 3-metil adenin (3meA)

oluşumuna neden olurken, tek zincirli DNA'da 1-metiladenin (1meA) ve 3-metilsitozin (3meC) oluşumuna neden olmaktadır. O⁶meG, metil grubunun enzimin aktif merkezindeki Cys aminoasitine transfer edilerek, MGMT tarafından doğrudan demetile edilir (Sedgwick ve ark., 2007).....20

Şekil 2.9 Üç farklı promotör tarafından başlatılan heterojen 5' uca sahip HIC1 transkriptleri. Çeşitli alternatif ekzon 1 iki kesim varyantı görülmektedir (Pinte ve ark., 2004).....23

Şekil 2.10 DAPK1 proteininin segmental yapısı. Tüm kalmodulin (CaM) tarafından regüle edilen serin/treonin protein kinazlar gibi 165 000 moleküler ağırlığındaki DAPK1 bir çekirdek katalitik kinaz alt birimi (kırmızı) ve bir CaM tanıma ve otoinhibisyon segmentleri içeren CaM regülatör alt birimi (sarı) içermektedir. Katalitik alt birim substrat özgülüğü ve CaM regülasyon alt birimi kinaz aktivitesinin regülasyonundan sorumludur. DAPK1, diğer pteinlerle olan etkileşim ve hücre içindeki lokalizasyonu kontrol eden katalitik olmayan bir dizi alt üniteye de sahiptir. Bu alt birimler, ankirin tekraraları (yeşil), P-Looplar (siyah), sitoskelet bağlanma bölgesi (mor) va ölüm domeinidir (mavi). Numaralar aminoasitlere işaret etmektedir (Van Eldik, 2002).....25

Şekil 2.11 Dap-kinaz proteinlerinin apoptozdaki rolü. Artmış Myc ve E2F ekspresyonu hem otoposforilasyon ile miyozin hafif zinciri ile etkileşime girerek hücre hareketlenmesini engeller. Hem de p19 üzerinden MDM2 yi inaktive ederek p53 ün stabilize olmasını ve apoptozun başlamasını aktive eder.....26

Şekil 2.12 Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının şematik gösterimi. Sol tarafta Wnt ligantının yokluğunda sitozolde aksin, APC, GSK-3, Ck1 ve katenin sitozol kompleksi oluşur. Katenin GSK3 ve CK1 tarafından fosforillenir ve TrCP aracılığıyla proteozom tarafından degrade edilir. Sağ tarafta, Wnt ligantının varlığında sinyal, Fz reseptör ve LRP5/6 ko-reseptör kompleksi indükler, Ck1 ve GSK3 LRP6'yı fosforile eder ve aksini de içeren protein kompleksi sitozolden hücre membranına transloke olur. Membran üzerinde Fz, aksin ve fosforile LRP5/6'nın bağlanması Dsh proteininin varlığını gerektirir. β - katenin nükleusa geçer, burada Lef ve Tcf ile kompleks kurarak hedef genlerin transkripsiyonunu uyarır.29

Şekil 2.13 SFRP proteinleri ve Fz reseptörlerinin şematik gösterimi. SFRP proteinleri Fz reseptörleri ile CRD (sisteince zengin alt birim) altbirimi ile ilişki kurar. NTR: Netrin benzeri alt birim, CD: sitoplazmik alt birim (Kawano ve Kypta, 2003)...30

Şekil 2.14 INK4a/ARF lokusu, p14 ^{ARF} (mavi) ve p16 ^{INK4a} (kırmızı) için iki açık okuma çerçevesi içerir. Her iki proteinin ikinci ve üçüncü ekzonları aynıdır. İlk ekzon alternatif kesim ile oluşur ve iki proteinin farklı fonksiyonlarından sorumludur. p16 ^{INK4a} RB proteinini fosforile eden CDK/4 ve 6'yı inhibe ederken, p14 ^{ARF} p53'ün MDM2 aracılıklı degradasyonunu inhibe eder.....	31
Şekil 2.15 Rb-p16 ^{INK4a} – Tümör süpressör yolağı hücre bölünmesini uyaran ve apoptozu engellemekten sorumlu E2F ailesi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu inhibe etmektedir (Poulsen ve ark., 2008).....	32
Şekil 3.16 BRAF kesim ürünlerinin görünümü. A- normal görünüm, B- kontrast görünüm. M: Markır (50 bç, Fermentas), heterozigot mutasyona sahip 8 numara ile gösterilmiş hastada hem normal uzunluktaki PCR ürünü (98 bç) hem de kesim ürünleri (47 ve 52 bç) görülmektedir.....	42
Şekil 3.17 Çalışma grubunda KRAS mutasyonları, tümör süpressör hipermetilasyon profillerinin strip görüntüleri.....	43
Şekil 4.18 Hasta grubundaki cinsiyet ve yaş dağılımları.....	44
Şekil 4.19 Çalışma grubunda bildirilen kolorektal kanser bölgeleri ve histolojik tip dağılımları.....	45
Şekil 4.20 Hasta grubundaki KRAS mutasyon frekansı.....	46
Şekil 4.21 Saptanan KRAS mutasyonlarının dağılımları.....	48
Şekil 4.22 Çalışılan hasta grubunda KRAS geni G:A transisyonları ve diğer baz değişimlerinin yüzdeleri.....	49
Şekil 4.23. MGMT promotör metilasyonu varlığında ve yokluğunda G:A transisyon mutasyonları ve diğer mutasyonların sıklıkları.....	50
Şekil 4.24 Çalışma grubunda saptanan BRAF V600E mutasyonunun sıklığı...51	51
Şekil 4.25 Çalışılan tümör süpresör genlerin hipermetilasyon frekansları.....53	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Tez kapsamında araştırılan KRAS ve BRAF mutasyonları ve neden olduğu amino asit değişimleri.....	34
Çizelge 4.2 Hasta grubundaki cinsiyet ve yaş dağılımları.....	44
Çizelge 4.3 Çalışma grubunda bildirilen kolorektal kanser bölgeleri ve histolojik tip dağılımları.....	45
Çizelge 4.4 Hasta grubundaki KRAS mutasyon frekansı.....	46
Çizelge 4.5 Saptanan KRAS mutasyonlarının dağılımları.....	47
Çizelge 4.6 Çalışılan hasta grubunda mutant KRAS genlerindeki G:A transisyonları ve diğer baz değişimlerinin yüzdeleri.....	49
Çizelge 4.7 MGMT promotör metilasyonu varlığında ve yokluğunda G:A transisyon mutasyonları ve diğer mutasyonların sıklıkları.....	50
Çizelge 4.8 Çalışma grubunda saptanan BRAF V600E mutasyonunun sıklığı..	51
Çizelge 4.9 Çalışılan tümör süpresör genlerin hipermetilasyon frekansları....	52
Çizelge 4.10 Hasta grubunda KRAS mutasyonu varlığı ile tümör süpresör gen hipermetilasyonu birliktelikleri.....	54
Çizelge 4.11 Hasta grubunda BRAF mutasyonu varlığı ile tümör süpresör gen hipermetilasyonu birliktelikleri.....	55
Çizelge 4.12 Kolorektal kanserli hastalara ait 14 adet mikroskobik olarak normal görünümlü kolon mukozasından elde edilmiş DNA'lara ait KRAS BRAF mutasyonları ve tümör süpresör gen promotör hipermetilasyon profilleri.....	56

EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayı.....	94
------------------------------------	-----------

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

A: Adenin

APC: Adenomatous polyposis coli

Bcl2: B-hücre lenfoma 2 geni (B-cell lymphoma 2)

BRAF: V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

BMPR1A: kemik morfogenetik protein reseptör tip 1A geni (bone morphogenetic protein receptor, type IA)

BPDE: benzo [a] piren diol epoksit

C: Sitozin

Ca²⁺/CaM: Kalsiyum/Kalmodülin

CACNA1G: Kalsiyum kanalı, voltaj bağımlı T tip alfa1 G alt ünitesi (Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit)

CDKN2A: Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A

CIMP: CpG metilatör fenotip

CK1, 2: Kazein kinaz 1 ve 2

COBRA: (Combined Bisulphite Restriction Analysis)

CpG: sitozin fosfo guanin

CTNNB1: β-katenin

DAPK1: Death associated protein kinase1

DAPK2: Death associated protein kinase1

dk: dakika

Dlk/ZIP kinaz: DAPlike kinase/Zipper interacting protein kinase

DMH: Farklı metilasyon hibridizasyon (Differential Methylation Hybridization)

DNA: Deoksiribonüleikasit

DNMT1: DNA metiltransferaz 1

DNMT2: DNA metiltransferaz 2

DNMT3a: DNA metiltransferaz 3a

DNMT3b: DNA metiltransferaz 3b

DRAK1,2: DAP kinase related apoptosis inducing kinase 1 ve 2

Dsh/Dvl: Dishevelled

Dkk: Dickkopf

EGF: Epitelyal growth factor (Epitelyal büyüme faktörü)

ER: Endoplazmik retikulum
ER α geni: Östrojen reseptör alfa geni
ERK: Ekstrasellüler sinyal tarafından düzenlenen kinaz
FAP: Familial adenomatoz polipozis koli
FGF-BP1: Fibroblast Growth Factor Binding Protein 1 (Fibroblast büyüme faktör bağlanma proteini 1)
Fz: frizzled membran reseptörleri
G: Guanin
GAP: GTPase activating protein
GBP: GSK-3 binding protein
GEF: Guanine nucleotide exchange faktor
GSK-3: Glycogen synthase kinase-3
HCC: Hepatocellular carcinoma
HELP: (HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation mediated PCR)
HIC1: Hypermethylated in cancer 1
HDAC: Histon deasetilaz
HiRE: HIC1 responsive element (HIC1 bağlanma bölgesi)
HNPCC: kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser
HRAS: Harvey rat sarcoma viral onkogen homolog
Hras1: HRAS geninin faredeki homologu
IGF2: İnsülin benzeri büyüme faktörü 2
IM-MSP: İmmün çöktürme- metil spesifik PCR
LRP5: Lipoprotein reseptör bağlantılı protein 5
LRP6: Lipoprotein reseptör bağlantılı protein 6
KRAS: Kirsten Rat Sarkoma
Kras2: KRAS geninin farelerdeki homologu
MAPK: mitojen-activated protein kinase
MAPKK: mitojen-activated protein kinase kinase
MAPKKK: mitojen-activated protein kinase kinase kinase
MEK: Serin/treonin spesifik protein kinaz
MEKK: Serin/treonin spesifik protein kinaz kinaz
MBD1-4: Metil bağlama proteini 1-4
MeCP2: Metil CpG bağlama proteini 2
MGMT: O⁶ metil guanin DNA metiltransferaz

ml: mililitre
MLH1: MutL homolog 1
MLH2: MutL homolog 2
MSP: Metil spesifik polimeraz zincir reaksiyonu
MSI: Mikrosatellit kararsızlığı
MYB: Miyeloblastik viral onkogen komolog geni
Myc: Transkripsiyon faktörü
MYOD: Miyojenik farklılaşma 1 geni
NDMA: Nitrozodimetilamin
NEUROG1: Nörogenin 1 geni
NNK: 4-(N-metil-N-nitrozamino)-1-(3-piridil)-1-bütan
MUTYH: MutY homolog geni, DNA gliksilaz
NRAS: Nöroblastoma RAS viral (v-ras) onkogen homolog
NSCLC: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
Nras: NRAS geninin farelerdeki homoloğu
P16^{INK4A}: Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF: Platelet derived growth factor
RNA: Ribonükleik asit
RUNX3: Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 3 geni
SAM: S-adenozil metionin
SARP: Secreted apoptosis-related protein
SDS: sodyum dodesil sülfat
SFRP2: Secreted frizzled- related protein 2
SIRT1: NAD-bağımlı deasetilaz sirtuin-1 geni
SMAD4: Mothers against decapentaplegic homolog 4 geni
sn: Saniye
SOCS1: Sitokin sinyali baskılayıcı gen 1 (Suppressor of cytokine signaling 1)
STK11: Serin treonin kinaz 11
T: Timin
TCF: ternary complex factors
TIMP1: Metallopeptidaz inhibitör 1
Wg: Wingless
Wnt: Wingless-type MMTV integration site family member

WIF-1: Wnt-inhibitory factor-1

β -TrCP: β -transducin repeat-containing protein

°: Derece

μ l: mikrolitre

\pm :Artı eksisi

1. GİRİŞ

Kolorektal Kanser gelişmiş ülkelerde ciddi morbidite ve mortaliteye yol açan önemli bir hastalıktır. Dünya genelinde kolorektal kanser hem erkekler de hem de kadınlarda 3. en yaygın kanser türüdür. Yapılan istatistikler ABD’de 2010 yılında 102.900 bireyde kolon kanseri ve 39.670 bireyde ise rektum kanserinin meydana geldiğini göstermektedir. Kolorektal kanser insidansı son 20 senede düşüş göstermiş; 1985 yılındaki 100.000’de 66.3’ den 2006 yılında 100.000’de 44.5’ e gerilemiştir. Bu azalma 1998-2006 yılları arasında hız kazanmıştır ve bu azalmanın nedeni kolorektal poliplerin kansere dönüşmeden tespiti ve uzaklaştırılmasını sağlayan kolorektal kanser tarama testlerinin kullanımındaki artışa bağlı olduğu düşünülmektedir. Kolorektal kanser insidansındaki genel düşüşün aksine 50 yaşın altındaki (kolorektal taramanın önerilmediği) bireyler arasındaki insidansı hem erkek hem de kadınlarda 1998 yılından bu yana % 2 civarında artış göstermiştir.

Yapılan istatistikler 2010 yılı içinde 51.370 kolon kanseri kaynaklı ölümün meydana geleceğini (kansere kaynaklı ölümlerin %9’u) göstermiştir. Yine son 20 yıl içinde kolorektal kanser kaynaklı ölüm oranı düşüş göstermektedir (Erkeklerde 2002-2006 yılları arasında %3.9 ve kadınlarda 2002-2006 yılları arasında %3.4 düşüş göstermiştir). Bu düşüş yine erken tanı ve tedavideki gelişmelerden kaynaklanmaktadır.

Kolorektal kanserde sağ kalım 1 yıl için % 83, 5 yıl için ise % 65’dir. 5 yıldan sonra sağ kalım süresi % 59 oranında bildirilmiştir. Erken tanı 5 yıllık sağ kalım süresini % 91’e çıkarmaktadır bununla birlikte kolorektal kanserlerin yalnızca % 39’u tarama yöntemlerinin yetersizliğinden dolayı erken evrede yakalanabilmektedir. Kanser bölgesel olarak çevre organlara ya da lenf nodlarına yayılmadığında 5 yıllık sağ kalım süresi % 70 oranında gözlenmektedir. Kanser uzak organlara yayıldığında 5 yıllık sağ kalım % 11 oranında gözlenir (Amerikan Kanser Birliği raporu, 2010).

Kolorektal kanser geniş bir coğrafik alanda gözlenir. En sık Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Yeni Zelanda, Avustralya gibi endüstriyel ülkelerde görülür. Ayrıca, ülke içinde de görülme sıklığı açısından farklı bölgeler mevcuttur. Kolorektal kanser insidansı özellikle kuzey Amerika, Avustralya, kuzey ve batı Avrupa’da yüksek, gelişmekte olan ülkelerde ise düşüktür. İnsidanstaki bu coğrafik farklılıklar, diyet ve çevresel faktörlerdeki farklılıklarla açıklanmaktadır (Parkin ve ark., 1999).

Kolorektal Kanser gelişmiş ülkelerde ciddi morbidite ve mortaliteye yol açan önemli bir hastalıktır. Ülkemizde ise en sık görülen 10 kanser sıralamasında 7,24/100.000 insidans ile 7. sırada olup (2004 KSDB verileri), yılda yaklaşık 5000 yeni

vaka görülmekte ve yaklaşık 3200 kolorektal kansere bağlı ölüm gerçekleşmektedir (<http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/sb/kanser/pdf/kolorektal.pdf>).

2. GENEL BİLGİLER

Kanser kelimesi kontrolsüz bir şekilde bölünen ve yayılan hücreler ile karakterize bir grup hastalığı tanımlamaktadır. Kanser hem çevresel faktörler (sigara kullanımı, mikroorganizma ve virüsler, kimyasallar ve radyasyon gibi) hem de internal faktörlerin (kalıtsal ve edinilmiş mutasyonlar, hormon salınımındaki değişimler, immün sistem yetersizlikleri gibi) birlikteliği sonucu gelişir. Çevresel faktörlere maruz kalma ve kanserin saptanabilir boyutlara ulaşması sıklıkla on veya daha fazla yıl sürer.

“Kontrolsüz çoğalma”, esas özellik olmakla birlikte, kanser hücresinin başka biyolojik karakteristikleri de vardır. Bunlar arasında hücre kültürlerinde kontakt inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için dış uyarılara (sinyallere) gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme sayılabilir (Hittelman ve ark., 2003). Başlangıçta “normal” olan bir hücrenin içinden çıktığı organizmanın ölümüne yol açabilecek bu olumsuz özellikleri sonradan nasıl edindiği, bir başka deyişle “onkogenezi” ya da “karsinogenezi” olarak adlandırılan bu süreçte hangi mekanizmaların rol oynadığı ancak yakın zamanlarda ve kısmen anlaşılabilmiştir. Onkogenezi mutasyonların etkisine ek olarak son yıllarda epigenetik değişikliklerin de hücrenin malign karakter kazanmasında önemli rol oynadığı anlaşılmıştır (Croce, 2008; Çefle, 2009).

Kanser çeşitlerinin çoğunda mutasyonlar somatik hücrelerde meydana gelir ve bu mutasyonlar üreme hücreleri ile gelecek nesillere aktarılmaz. Ancak kanser vakalarının %1’inde, eşey-kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılır ve bu değişim, yeni neslin kansere yatkınlığını oluşturur. Bazen kalıtsal mutasyonlar kanser oluşumunda tek başına yetersiz kalır. Kanser oluşumunun tamamlanması için bazı genlerde homolog lokuslarda ilave somatik mutasyonlar gerekir. Hangi durumda olursa olsun, kanser hücre seviyesinde genetik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir (Klug ve Cummings, 2002)

Ölüm nedeni olarak kanser, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. Sağlık bakanlığı kanser kontrol bölümü tarafından 2005 yılında yayınlanan rapora göre ülkemizde 2000 yılında 56.250 kanser kaynaklı ölüm meydana gelmiştir ve kanser kaynaklı ölüm oranı % 13.1 olarak saptanmıştır. Bu oranın 2010 yılında %14,

2020 yılında %15.2 ve 2030 yılında ise % 16.2 olacağı tahmin edilmektedir (Yardım ve ark., 2007).

Kanserin yüzden fazla değişik türü mevcuttur. Onkolojide neoplazmın potansiyel klinik davranışının değerlendirilmesine göre benign ve malign olarak ikiye ayrılır. “Benign” tümör sitolojik ve gros özellikleri nisbeten masum yani çevredeki dokuya zarar vermeyen ve yayılmayan, lokal cerrahi müdahale ile çıkarılabilen ve hastanın sağkalımını etkilemeyen tümör türüdür. Malign tümörlerin hepsi kanserdir ve benign (iyi huylu) tümörlerin aksine başka dokulara sızma (invazyon) ve yayılma (metastaz) özelliği gösterir (Klug ve Cummings, 2002).

Kanserler hücre ve dokuların çeşidine göre gruplandırılır. Epitelyal hücrelerde meydana gelen kanserler karsinom, bağ doku veya kas hücrelerinde meydana gelen kanserler sarkom olarak isimlendirilir. Bu iki kategorinin hiç birine uymayan kanserler hemopoetik hücrelerden köken alan çeşitli lösemiler ve sinir sistemi hücrelerinden kaynaklanan kanserleri kapsar (Bahçeci, 1997).

2.1. Kolorektal Kanser

Kolon ve rektum, sindirim sisteminin “kalın bağırsak” olarak adlandırılan kısmını oluşturur. Kalın bağırsakların yaklaşık 150-180 cm’lik üst kısmına “kolon”, 15-17 cm’lik alt kısmına ise “rektum” adı verilir.

Yiyecekler, midede ve ince bağırsaklarda sindirildikten sonra kalın bağırsaklara gelirler. Burada bağırsak içeriğinin içinde sindirim sisteminin daha üst kısımlarında emilmemiş olan su da vücutta emilerek geriye ‘gaita’ olarak adlandırılan katı kısım kalır. Gaita, kolon ve rektum boyunca ilerleyerek daha sonra anüs yoluyla vücuttan atılır. Sindirim sisteminin son kısmını oluşturan kalın barsakta oluşan kanserler genel olarak kolorektal kanserler olarak da adlandırılır. Kalın barsağın son kısmı olan rektumda oluşursa rektum kanseri, daha önceki kısımlarında oluşursa kolon kanseri olarak isimlendirilir.

Tümörler kolon ve rektumun herhangi bir bölgesinde oluşabilir. Kanser hücreleri kolon ve rektum dışına genelde lenf (akkan) yoluyla yayılırlar. Kolon ve rektum kanserleri karaciğer, akciğerler, beyin, böbrekler ve mesaneye yayılabilirler. Kanser vücudun diğer bir bölgesine yayıldığında, o bölgede yayıldığı yerdeki türden bir tümör oluştururlar ve aynı adla anılırlar. Örneğin bağırsak kanserleri, karaciğere yayıldığında karaciğerde oluşan tümör kolorektal kanser hücrelerinden oluşmuştur. Bu durum

“metastatik kolorektal kanser” veya “karaciğere metastaz yapmış kolorektal kanser” olarak adlandırılır.

Kolon ve rektum kanserlerinin dağılımına bakıldığında araştırmaların önemli bir kısmı paralellik gösterir. Tümörlerin önemli bir kısmı rektosigmoid bölgede (%55-60), inen kolonda (%10-15), transvers kolonda (%5-10) ve çıkan kolon ve çekumda (%15-20) yerleşir (Sayek, 2004).

Daha çok ileri yaş grubu olarak bilinen kolorektal kanserin görülme sıklığı 50 yaşından sonra giderek artar ve 80 yaşında maksimale ulaşır. Ortalama yaş erkeklerde 63, kadınlarda 62’dir. Kolorektal kanser ülkemizde ve dünyada erkeklerde kadınlardan daha sık görülmektedir. Sebepleri tamamen anlaşılmamasına rağmen sigara ve alkol kullanımı, erkeklerde abdominal obezitenin daha çok görülmesi ve hormonal farklılıklara bağlanmaktadır (Büyükdoğan, 2009).

Kolorektal kanser genellikle kanserleşmemiş polipler şeklinde başlar. Bir polip kolonu astarlayan hücrelerin sayısındaki artıştır. Normal mukozadan de-novo gelişmiş küçük bir kolorektal kanser son derece seyrekdir. Bu neoplazmların çoğunun öncül adenomlardan (adenomatoz polip) geliştiği düşünülmektedir (Sayek, 2004).

Kolorektal kanserin histolojik tipleri adenokarsinom (iyi, orta, kötü diferansiye), müsinöz adenokarsinom, taşlı yüzük hücreli karsinom, skuamöz diferansiasyon gösteren karsinom (Adenoskuamöz, saf skuamöz), saydam hücre komponentli karsinom, bazaloid karsinom, koriokarsinomatöz diferansiasyon gösteren adenokarsinom ve nöroendokrin tümörlerdir. En fazla görülen kanser tipi adenokarsinom olup tüm tümörlerin %85’ini oluşturur (Büyüldoğan, 2009).

Kolorektal kanserlerin evrelendirilmesinde Dukes sistemi kullanılır ve 4 evreden oluşur.

Evre A: Tümör barsakta sınırlı, muscularis propria ötesine penetre olmamış.

Evre B: Tümör muscularis propria ötesine geçmiş, olası seroza tutulumlu.

Evre C: Lenf bezi metastazları.

Evre D: Uzak metastazlar (Büyükdoğan, 2009).

Kolorektal kanserlerin yaklaşık %3-5’ini kalıtsal kolorektal kanser sendromları oluşturmaktadır. Bu sendromlar temel olarak adenomatöz polipozis sendromları ve hamartomatöz polipozis sendromları olmak üzere ikiye ayrılır (Kaz ve Brentnall, 2006).

Adenomatöz polipozis sendromlarından otozomal dominant geçişli ailesel adenomatöz polipozis (FAP) sendromu kolorektal kanserlerin %1’ini oluşturur. Normalde yüzlerce benign poliple seyreden bir durum söz konusudur. Tedavi

edilmediği zaman bu kansere sahip tüm bireyler zamanla kolorektal kanser geliştirir. FAP'ın dört varyantı mevcuttur: i) Gardner sendromu (adenomlar yalnız kolonda değil mide duodenum ve ince barsakta da oluşabilir), ii) Turkot sendromu (kolon yerleşimli adenomatöz polipozise, nöroepitelyal santral sinir sistemi tümörleri eşlik etmektedir), iii) Ailesel adenomatöz polipozis koli (Tüm gastrointestinal sistemi tutabilen, daha çok kolon ve rektumda çok sayıda polipoid oluşumu ile karakterizedir) ve iv) AFAP (daha az sayıda kolon adenomları ve daha geç yaşta kanser gelişimi ile karakterizedir ve FAP'ın daha ılımlı bir formudur). Ailesel adenomatöz polipozis sendromlarının %90'ı APC geninde mutasyon taşımaktadır. APC mutasyonlarının gen üzerindeki yerleri FAP fenotipini belirleyebilmektedir. Ekzon 15 mutasyonları yüzlerce kolonik poliplerin gelişimi ile sonuçlanırken, genin 3' ve 5' veya ekzon 9'da meydana gelen mutasyonlar AFAP sendromu ile sonuçlanmaktadır (Kaz ve Brentnall, 2006; Büyükdoğan 2009).

Adenomatöz polipozis sendromlarından kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser sendromu (HNPCC, Lynch sendromu) erken başlama yaşı ile karakterizedir ve güçlü ailesel geçiş gösterirler. FAP'ın aksine HNPCC fenotipi nonspesifiktir ve HNPCC hastalarını tanımlamak için çeşitli tanı kriterleri geliştirilmiştir.

Hamartomatöz polipler nonmalign doku kitleleridir fakat sayıları çok artarsa kansere yatkınlık oluşturabilirler. Hamartomatöz polipozis sendromlarından juvenil polipozis sendromu otozomal dominant geçişlidir. Polipler genellikle kolon ve rektumdadır. Puberte sırasında kaybolabilir. Polip sayısı 10'dan fazla ise juvenil polipozis olarak adlandırılır ve kanser riski taşır (Büyükdoğan 2009). Diğer bir hamartomatöz polipozis sendromu olan Peutz-Jeghers sendromu gastrointestinal sistem boyunca en çok ince barsaklarda, daha az oranda mide ve kolonda olmak üzere 1-4cm büyüklüğünde hamartomatöz polipler ile birlikte, dudaklar ve ağız mukozasında melanin lekeleri ile karakterizedir. Otozomal dominant geçişlidir (Büyükdoğan, 2009).

2.1.1. Kolorektal Kanser Etiyolojisi

Kolorektal kanserler hayvansal yağlarca zengin kırmızı et tüketiminin yaygın olduğu ve buna ek olarak fiziksel aktivite ve sebze tüketiminin az olduğu batı tipi beslenen populasyonlarda sıklıkla gözlenmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, et tüketimi, sigara ve alkol kullanımının kolorektal kanser için risk faktörü olduğunu göstermiştir (Khuhaprema ve Srivatanakul, 2008). Diyetle fazla miktarda yağ alımı karaciğer tarafından yapılan kolesterol ve safra asiti sentezini artırır ve kolonda bu sterollerin miktarı artar. Kolon bakterileri bu bileşikleri sekonder safra asitlerine ve

diğer toksik metabolik bileşiklere dönüştürür. Safra asitleri ve serbest yağ asitlerinin her ikisinin kolon mukozasına hasar yaptığı ve epitelyum hücrelerinin çoğalma aktivitesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (Erarslan ve Türkay, 2007). Bununla birlikte düzenli balık eti tüketiminin kolorektal kanser riskini düşürebileceğine ilişkin çalışmalar mevcuttur (Jedrychowski ve ark., 2008). Balık ve balık yağının kolon mukoza hücrelerinin mitoz ve apoptoz fonksiyonlarını düzenlemede etkili olduğu ayrıca balık yağındaki omega-3 ve omega 6 polidoymamış yağ asitlerinin inflamasyon kaynaklı kolorektal kanserlerini önlemede etkili olduğu düşünülmektedir (Yee ve ark., 2009). Kalsiyum ve vitamin D tüketimi antimitotik etkisinden dolayı kolorektal kansere karşı koruyucu olarak düşünülmektedir. Amerika’ da 2009 yılında yapılan bir araştırma ile kalsiyum tüketiminin kolorektal kanser riskini erkeklerde 0.79, kadınlarda 0.72 oranında azalttığı belirlenmiştir (Park ve ark., 2009). Diyetle yeterli miktarda folat, metionin, riboflavin ve vitamin B6 düzensiz DNA metilasyonunu önlediği için kolorektal kanser riskini azaltmaktadır.

Yaş, adenomların prevalansını belirleyen en önemli risk faktörüdür. Genel popülasyonda 40 yaşından sonra kolorektal kanser gelişme riski artmaya başlar ve her on yılda katlanarak artar. Kolorektal kanserlerin %90’ından fazlası 50 yaşından sonra geliştiğinden tarama programlarını başlatma yaşı 50 olarak kabul edilmiştir. Özgeçmişte adenom veya karsinom hikayesi veya ailede kolorektal kanser varlığı kolorektal kanser gelişimi riskini arttırmaktadır. İnflamatuvar barsak hastalığı ve özellikle ülseratif kolotit kolorektal kanser riskini arttırmaktadır (Erarslan ve Türkay, 2007).

2.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri ve Kanser Genetiği

Kanserler ekzojen kimyasalların mutajenik etkisi (Nikel, arsenik, nitrosaminler, akrilaminler, benzopiren, aflatoksin gibi), fiziksel karsinojenlerin mutajenik etkisi (Ultraviyole, iyonize radyasyon gibi), biyolojik karsinojenler (Human Papilloma Virus, Hepatit B virüsü, Helikobakter Piloni gibi) ve endojen işlemlerin mutajenik etkisi (DNA replikasyonundaki hatalar, reaktif oksijen türleri üreten metabolik reaksiyonlar, kronik inflamasyon gibi) tarafından tetiklenirler. Farklı faktörler tümör gelişiminin farklı aşamalarında etkisini gösterirler.

Kanser türlerinin çeşitliliğine rağmen kanser hücreleri bazı temel özellikleri paylaşırlar. Kanser hücrelerinin en belirgin özelliği artmış ve otonom hücre bölünmesidir. Genel olarak bir dokuda hücre sayısının artması hiperplazi olarak

adlandırılır. Hiperplazinin artması ve hücre farklılaşmasının eklenmesi (displazi) ile benign tümörler oluşur. Displazi ilerlemesi malign tümörlerin oluşumu ile izlenir ve bu durum “preneoplastik değişim” olarak kabul edilir. Hücre sayısındaki artış çoğu durumda yetersiz apoptoz ile birleşmektedir. Aşırı hücre bölünmesi hücre metabolizmasında değişiklikler gerektirir. Bölünen hücreler için daha fazla nükleotid biyosentezi, protein ve yağ asitleri sentezine gereksinim olması hasta için tümör yükü ile birlikte artmış enerji talebini doğurur. Değişen metabolizma hastanın başa çıkması gereken laktat gibi bazı metabolik yan ürünlerin salınımını arttırır. Dahası kanser hücreleri tümör nekroz faktör α (TNF α) gibi bazı sitokinler ile immün sistemi baskılayarak fırsatçı enfeksiyonların yayılımını kolaylaştırır. Kanser geliştikçe genomdaki değişimlerin miktarı artar. Bu durum genomik kararsızlık olarak tanımlanır ve başlangıçta homojen olan kanser hücrelerinin mutasyon ve epigenetik değişimleri biriktirerek daha hızlı bölünebilen ve yayılabilen yeni klonların oluşumu ile sonuçlanır. Çoğu kanser hücresi, genomik instabilitenin sonucu olarak telomerazın yeniden aktivasyonu ve dolayısı ile ölümsüzlük özelliği kazanırlar. Bölünerek sayısı artan hücre topluluğu zamanla kendi kan ve lenf damarlarını oluşturur (neoanjyogenez), epitelyum ve mezenşim dokularını ayıran bazal membranı geçerek bağ ve kas dokularına yayılır (invazyon) ve kan ve lenf yoluyla başladığı organdan daha uzak organlara yayılır (metastaz) (Schulz, 2005).

Kanser hücresinin büyüme ve çoğalma süreci, meydana gelen genetik değişiklikler (onkogenler, tümör süpresör genler), konakçı faktörleri (enzim polimorfizmi) ve tümör konakçı etkileşimi (anjyogenez, invazyon, metastaz) ile yakından ilişkilidir (Fong ve ark., 1999). Onkogenler ve tümör süpresör genler kanser oluşumunda genetik ve epigenetik olarak değişime uğrayan iki büyük hücresel gen sınıfıdır. İlk zamanlar kansere neden olma özelliğine sahip tüm genler onkogen olarak isimlendirilmesine karşın, fonksiyon kaybı nedeni ile kanser oluşumuna katkıda bulunan ‘tümör süpresör’ genlerin tanımlanmasıyla ‘onkogen’ terimi fonksiyon kazanımı yoluyla tümör oluşumuna katkıda bulunan genler ile sınırlandırılmıştır (Knowless ve Selby, 2005).

2.2.1. Onkogenler

Onkogenler ilk olarak tümör oluşturan virüslerde saptanmıştır. Onkogenler aslında, hücre döngüsü, büyüme, gelişme ve farklılaşmada rol alan genlerdir. Normal işlevini yerine getiren bu genler proto-onkogen olarak adlandırılırlar. Fakat normalin

dışında aktive edildikleri veya fazla ya da sürekli eksprese edildiklerinde kanser gelişimine neden olabilirler. Kanser gelişimini uyarmak için bir proto-onkogenin iki kopyasının sadece birinde mutasyon olması yeterlidir. Bir proto-onkogen üç şekilde onkogene dönüşebilmektedir: Nokta mutasyonları, translokasyonlar ve aşırı gen ifadesi (Knowless ve Selby, 2005).

2.2.2. Tümör Süpresör genler

Tümör süpresör genler, fonksiyonları hücre bölünme ve farklılaşmasını kontrol etmek ve baskılamak olan genlerdir. Tümör süpresör genlerin fonksiyon kaybı çoğu zaman her iki allelinde mutasyonel veya epigenetik olarak inaktivasyonunu gerektirir (Knowless ve Selby, 2005).

2.3. Tez Kapsamında Çalışılan Onkogenler

2.3.1.KRAS Geni

1982 yılında insan LX-1 akciğer kanseri hücrelerinin genomik DNA'sından orjin alan bir gen, fibroblast transforme edici aktiviteye sahipti ve Kirsten Rat Sarkoma virüsün transforme edici geninin homoloğu idi. Bu KRAS'ın insan kanserlerinde onkogen olarak ilk ortaya çıkışıdır. Bugün KRAS kanserlerde en fazla aktive olan onkogen olarak bilinmektedir ve tüm insan kanserlerinin %17-25'i bu gende mutasyon içerir (Kranenburg, 2005).

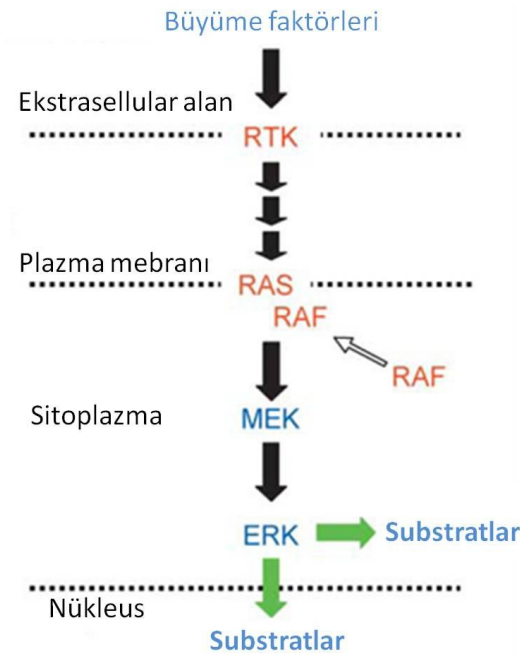
KRAS insan RAS onkogen ailesine dahildir. Bu gen ailesi 3 gen içerir: HRAS, KRAS, NRAS; bu genlerin farelerdeki homologları sırası ile Hras1, Kras2 ve Nras'tır (Lee, 2008). KRAS membrana bağlı bir G proteindir ve başlıca MAPK (Mitojen activated protein kinase) ve P13K sinyal iletim yollarında yer alır (Riely ve ark., 2009).

2.3.1.1. MAPK Sinyal İletim Yolağı ve KRAS ve BRAF

MAPK (mitojen-activated protein kinase, mitojenler tarafından aktive edilen kinaz) metabolik yolları hücre bölünmesinden farklılaşma ve apoptoza kadar çok farklı hücresel işlemleri düzenlerler (Qi ve Elion, 2005). MAP kinaz terimi, sitokinler, büyüme faktörleri, nörotransmitterler ve hücresel stres gibi çeşitli sinyallere cevap olarak her biri diğerini fosforile ederek aktive eden üç kinazdan oluşan bir modüle işaret

eder: RAF (diğer isimleri: MAPKKK veya MEKK), MEK (MAPKK) ve ERK (MAPK) (Orton ve ark., 2005).

Memeli hücrelerinde MAPK kaskadı EGF, PDGF gibi bir tirozin kinaz reseptörün aktivasyonu ile başlar. Reseptör bir “adaptör protein” aracılığı ile RAS yolağını aktive eder. RAS önce RAF’ı (MAPKKK) aktive eder. RAF, MEK’i (MAPKK) fosforile ederek aktifleştirir. MEK MAPK’ı aktive eder. Aktive olan MAPK çekirdekte hücre bölünmesi ve farklılaşmasını kontrol eden transkripsiyon faktörlerini (JUN, FOS, MYB, MYC gibi) fosforile ederek aktive eder (Şekil 2.1) (Schulz, 2005) Bu yolak kanserlerin yaklaşık %30’unda hiper aktive durumdadır.



Şekil 2.1 RAS/MAPK sinyal iletim yolağı (Garnett ve Marais, 2004)

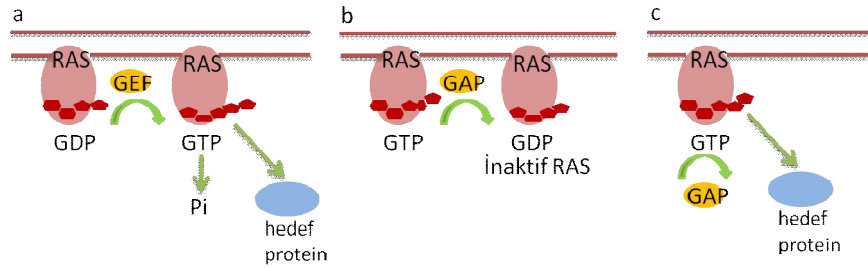
2.3.1.2.PI3K Sinyal İletim Yolağı

PI3K sinyal iletim yolağı glikoz taşınımı ve kullanımı, protein biyosentezi, hücre büyümesinin düzenlenmesi, apoptozun engellenmesi gibi hücresel işlemlerin kontrolünde yer alır. Yolak aktif tirozin kinaz reseptörleri tarafından uyarılan RAS proteinleri tarafından başlatılır. PI3K sinyal iletim yolağı klasik bir tümör süpressör olan PTEN’in bu yolağın inhibitörlerinden olması ve PI3K’ında özellikle yumurtalık

kanserlerinde onkogen olarak vurgulanması nedeni ile önemli bir kanser yolağıdır (Schulz, 2005).

2.3.1.3.KRAS Geni ve Aktivasyonu

RAS aktivasyonu ekstrasellular mitojenlerin varlığında gerçekleşir. Ekstrasellular ligantlar tarafından aktive edilen reseptör tirozin kinaz bir adaptör protein olan Grb2'nin SH2 alt birimi ile etkileşir. Grb2'nin SH3 alt birimi GEF (guanine nukleotide exchange factor, SOS) ile birleşir. GEF, RAS'a bağlı GDP'yi GTP ile değiştirir. GTP'ye bağlı RAS aktiftir ve RAF'ı aktive eder. GAP (GTPase activating protein) RAS'ın GTPaz aktivitesini tetikleyerek ve GDP'ye bağlı inaktif RAS'ı meydana getirir (Şekil 2.2) (Levin, 2008).



Şekil 2.2 KRAS'ın aktivasyonu a. Ekstrasellüler sinyal varlığında GEF RAS'a bir guanin bağlayarak aktive olmasını sağlar b. Sinyalin olmaması durumunda GAP RAS'ı GTP hidrolizi için stimüle eder. GDP'ye bağlı RAS inaktif haldedir. c. Mutant RAS GAP'a duyarsızlaşır ve ekstrasellüler sinyalden bağımsız halde sürekli aktif formda kalır.

İnsan KRAS geni 12p12.1'de lokalizedir. 45.675 bç büyüklüğündeki gen, 188 amino asitlik 21.66kD'luk KRAS proteinini şifrelemektedir. İnsan tümörlerinin yaklaşık %90'ı RAS genlerinde veya RAS metabolik yolunun diğer bileşenlerinde mutasyon içermektedir (Adjei, 2001a). RAS proteinleri aktif-GTP bağlayan ve inaktif-GDP bağlayan konfigürasyonlar arasında düzenli olarak değişmektedir. RAS-GDP/GTP düzeyleri guanin nükleotid değişim faktörleri ve GTPaz aktive edici proteinler tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu regülasyonun bozulması tümör oluşumu ile sonuçlanır (Lee, 2008). Her üç RAS geninde de tümörigenezden sorumlu mutasyonlar görülebilmeye karşın mutasyonel olarak aktive edilmiş KRAS %17-

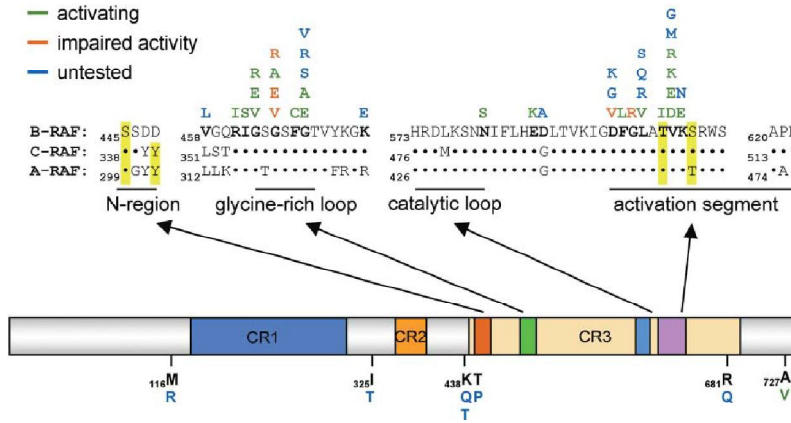
25'lik oranla insan tümörlerinde mutasyon frekansı en yüksek olan RAS genidir (Heinemann ve ark, 2009). Sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %40'ında (%20-50) onkogenik KRAS mutasyonları gözlenmektedir (Heinemann ve ark, 2009 Rajagopalan ve ark, 2002). KRAS mutasyonları genellikle somatik nokta mutasyonlardır. Patojenik KRAS mutasyonlarının %90'ı 2. ekzon kodon 12 ve 13 de meydana gelmektedir (Brink ve ark 2003).

2.3.2. BRAF Geni

RAF ailesi genleri ilk olarak fare ve tavuklarda tümöre neden olan retrovirüs vektörlerde onkogen olarak belirlenmişlerdir (Beeram ve ark., 2005). İnsanlarda 3 RAF izoformu bulunmaktadır: ARAF, BRAF ve CRAF (Raf-1). RAF proteinleri birer serin/treonin kinazdır ve MAPK sinyal iletim yolağında RAS proteinleri tarafından aktive edilirler (Garnett ve Marais, 2004). RAF proteinleri üç korunmuş bölgeden oluşmaktadırlar; N terminalindeki CR1 ve CR2 regülatörken, C terminalindeki CR3 alt birimi kinaz özellik sergilemektedir (Şekil 2.3). RAF regülasyonu karmaşıktır ve bir çok basamak içerir. Özet olarak aktif RAS sitozolik RAF'ın kinaz alt ünitesindeki aktivasyon segmentinde bulunan iki aminoasiti (T598 ve S601) plazma membranında fosforile eder. Negatif yük düzenleyici bölgenin (N region) fosforilasyonu da gereklidir ve bu bölge RAF izoformlarının farklı regülasyonu için önemlidir. BRAF'da bu bölgedeki S445 aminoasiti sürekli olarak fosforiledir. Böylece ARAF ve CRAF'ın aksine BRAF sürekli olarak negatif yük taşır ve aktive olmak için yalnızca aktivasyon segment fosforilasyonu yeterlidir. CRAF ve ARAF aktivasyonu negatif yük düzenleyici bölgenin de her seferinde fosforilasyonunu gerektirir (Garnett ve Marais, 2004).

İnsan BRAF geni 7q34'da yerleşmiştir. 651 amino asitlik ve 72.5 kD molekül ağırlığındaki BRAF proteinini şifrelemektedir. BRAF genindeki mutasyonlar iki yolla hastalık oluştururlar. BRAF genindeki kalıtsal mutasyonlar doğuştan gelen hasarlara neden olmaktadır. Kalp problemleri, zeka geriliği ve hastalığa özgü yüz görünümü ile karakterize kardiofaciocutaneous sendromu bu gendeki kalıtsal mutasyonlar tarafından oluşturulmaktadır. Hayatın ileri evrelerinde oluşan somatik BRAF mutasyonları kansere neden olmaktadır. BRAF geninde insan kanserleri ile ilişkili otuzdan fazla mutasyon tanımlanmıştır. BRAF mutasyonları melanoma ve nevüste %80'i aşkın bir sıklıkta gözlenmektedir. Akciğer kanserlerinde ortalama % 1-3, kolorektal kanserlerde % 5 civarında bildirilmiştir (Namba ve ark., 2003). Bildirilen mutasyonların % 90'ı 600.

kodonda aktivasyon segmentinde bulunan valinin glutamik asite dönüştüğü missens mutasyondur. Bu mutasyon en yaygın olarak tiroit kanseri, kolorektal kanser ve melanomalarda gözlenmektedir (Deng ve ark., 2004). Diğer mutasyonlar, R461I, I462S, G463E, G463V, G465A, G465E, G465V, G468A, G468E, N580S, E585K, D593V, F594L, G595R, L596V, T598I, V599D, V599E, V599K, V599R, K600E, A727V şeklindedir ve glisince zengin P-loop'ta ve aktivasyon segmentinde yoğunlaşmışlardır (Wan ve ark., 2004). Aktivasyon segmentinde meydana gelen mutasyonlar RAF'ı inaktif durumdan aktif duruma kitlerler. Örneğin V600E mutasyonunun oluşturduğu valinden kaynaklanan alifatik bölge P-loop'taki phe467'nin fenil halkası ile etkileşime geçmektedir. Ayrıca BRAF'taki Mutasyon tipine bağlı olarak MEK'in aktivitesi de değişkenlik gösterebilmektedir.



Şekil 2.3 BRAF proteininin şematik gösterimi. Şemada RAF proteinlerinin Korunmuş 3 alt birimi CR1, CR2 ve CR3 görülmektedir. CR3 alt birimi kinaz aktivitesine sahiptir. ARAF, BRAF ve CRAF için N bölgesi, aktivasyon segmenti glisince zengin bölge ve katalitik bölge oklarla gösterilmiştir. Aminoasit dizileri üzerindeki sarı işaretlemeler kinaz aktivitesi için gerekli fosforilasyon bölgelerini göstermektedir. Kanser ile ilişkili BRAF mutasyonları koyu rekle simgelenmiş ve değişen amino asitler dizi üzerinde gösterilmiştir. Mutant amino asitler aktive edici mutasyonlar için yeşil, BRAF kinaz aktivitesini bozanlar için kırmızı ve etkisi bilinmeyen mutasyonlar için mavi renkte gösterilmiştir. ARAF, BRAF ve CRAF için korunmuş aminoasitler nokta ile gösterilmiştir (Garnett ve Marais, 2004).

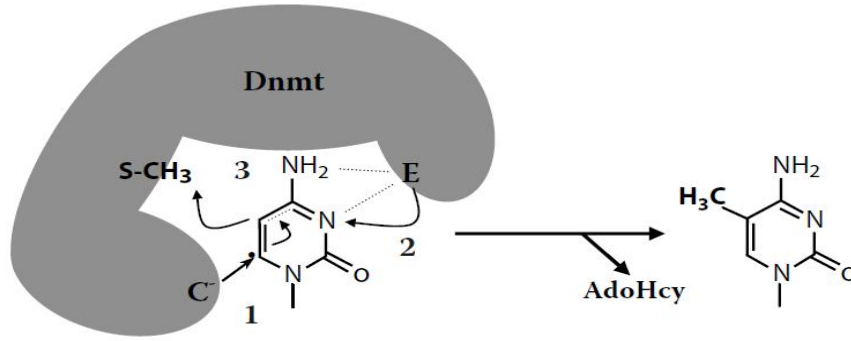
2.4. Epigenetik ve Kanser

Normal hücre homeostasisinin devamı kompleks mekanizmalar tarafından düzenlenir. Bu mekanizmalar içinde gen ekspresyonunun regülasyonu çoğunlukla epigenetik yolla yapılmaktadır. Epigenetik kelime anlamı olarak DNA dizisinden bağımsız bir genetik bilgiye işaret etmektedir. Epigenetik terimi Yunan filozof Aristo'nun "epigenesis" teorisinden köken almaktadır ve ilk olarak 1940 yılında Waddigton tarafından "genlerin fenotipi değiştirecek biçimde çevre ile etkileşimleri" şeklinde tanımlanmıştır. Epigenetik bugün, gen fonksiyonunun düzenlenmesinde en önemli mekanizmalardan biri olarak bilinmektedir ve farklı hücre tiplerinde farklı gen ekspresyon paternlerinin oluşumu ve sürdürülmesinden sorumludur.

DNA ve kromatin yapısındaki epigenetik değişimler hem kalıtsal hem de dinamik yapıdadır. Bölünme esnasında hücre epigenetik işaretlerini korumaya meyillidir fakat bu işaretler çevresel faktörler tarafından değiştirilebilirler (Friso ve Choi, 2009). Bir hücrenin epigenetik paternlerindeki değişimler mental retardasyon, immün yetmezlik ve/veya sporadik ya da kalıtsal kanserlerle sonuçlanabilir (Costello ve Plass, 2001). Epigenetik mekanizmalar DNA ve kromatin metilasyonu, histon asetilasyonu, siRNA'lar, übikütinasyon, sumoilasyon ve fosforilasyondur. Tüm bu mekanizmalar, kromatin yapısında değişiklikler oluşturarak transkripsiyonu düzenleyici komplekslerin DNA'ya ulaşabilirliğini etkilerler. Burada DNA metilasyonuna ayrıntılı olarak değinilecektir.

2.4.1. DNA Metilasyonu

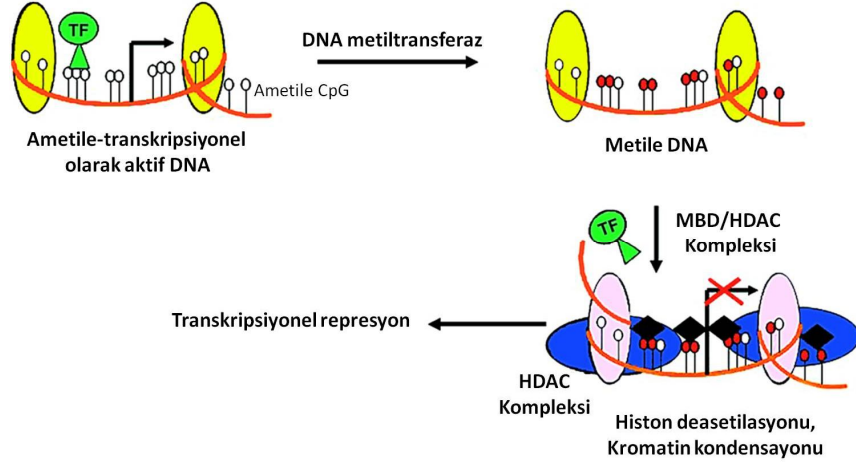
Memeli hücrelerinde sitozin bazının yaklaşık %3-5'i 5-metilsitozin (episitozin) formunda bulunmaktadır. Bu modifikasyon DNA replikasyonunda sonra meydana gelir ve metil vericisi olarak S-adenozil metionini (SAM) kullanan DNA metiltransferazlarca katalizlenir (Şekil 2.4) (Mompalmer ve Bovenzi, 2000). DNA metilasyonu gen ekspresyonunun kontrolü, kromozomal yapının korunumu ve rekombinasyonel olayların kontrolünden sorumludur. DNA metilasyon paterni embriyogenezin ilk aşamalarında neredeyse sıfırlanmıştır ve gelişme esnasında metiltransferazlarca oluşturulur. Bu gün 4 farklı DNA metiltransferaz enzimi bilinmektedir: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b. DNMT1 aktivitesi daha çok hemimetile DNA üzerindedir. DNMT1 replikasyon çatalı üzerinde iş görür ve yeni bölünen hücrelerde DNA metilasyonunun sürdürülmesinden sorumludur (Costello ve Plass, 2001).



Sekil 2.4 5-metilsitozinin DNA metiltransferazlarca oluşturulması. S-CH₃, SAM'in S- metil grubunu simgelemektedir (Friso ve Choi, 2009).

DNMT2 DNA substratlarında metilleyici aktiviteye sahip değildir. Yayımlanmış iki makalede DNMT2'nin RNA metiltransferaz olarak işlev gördüğü ileri sürmüştür (Goll ve ark., 2006; Rai ve ark., 2007). DNMT3a ve DNMT3b, de novo metilaz olarak fonksiyon görmektedir. Hemimetile ve ametile DNA'yı eşit etkinlikle metilleyebilmektedirler (Mompalao ve Bovenzi, 2000).

5- metil sitozin bazının yaklaşık olarak %70-80'i CpG dinükleotid dizilerinde bulunmaktadır (p fosfodiester bağımlı olarak, sitozin fosfo guanin). CpG dinükleotidleri yüksek frekansta buldukları zaman CpG adası olarak isimlendirilirler. Genomun %35'ini oluşturan bu diziler genellikle hipermetiledir ve doku spesifik genlerin promotörlerinde yer almaktadırlar. CpG adaları 200 bp'den birkaç kilobaza kadar değişik uzunluklarda olabilmektedirler. Genomda 29000 adet CpG adasının bulunduğu ve tüm genlerin % 50-60'ının promotöründe CpG adası bulunduğu tahmin edilmektedir (Mompalao ve Bovenzi, 2000; Clark ve Melki, 2002). Promotör bölgedeki CpG adalarının metile olması bu bölgelere transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek transkripsiyonun inhibe olmasına neden olur (Esteller, 2005). Ayrıca metil-CpG bölgelerine bağlanan proteinler (MeCP2 ve MBD1-4 proteinleri) transkripsiyon kompleksinin oluşumunu engelleyerek transkripsiyonu bloke ederler (Şekil 2.5) (Manoharan ve ark., 2007).



Şekil 2.5 Gen ekspresyonunun epigenetik olarak baskılanması. DNA metiltansferazlar CpG dinükleotidlerinin metillenmesini sağlar. Bu bölgelere Metil bağlayıcı protein ve Histon deasetilazlar bağlanarak transkripsiyon faktörlerinin bu bölgelere bağlanmasını engeller ve transkripsiyonu baskılar. Bu durum histon deasetilasyonu ve kromatin kondensasyonu ile sonuçlanır. (Manoharan ve ark, 2007'den).

2.4.2. DNA Metilasyonu ve Kanser

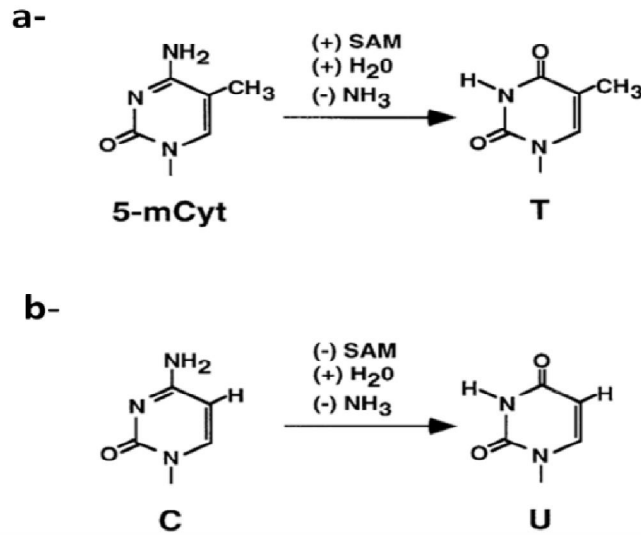
İnsan kanserlerinde ilk olarak 1989 yılında Rb geninde CpG metilasyonunu bildirilmiştir. Birkaç yıl sonra ilk onkogen mutasyonu H-RAS geninde bildirilmiştir. Sodyum bisülfid modifikasyonu ve metilasyon spesifik PCR gibi tekniklerin gelişimi ile DNA metilasyonu çalışmalarının önü açılmıştır (Esteller 2002).

Kanserde metilasyon paterni değişimleri genom çapında hipometilasyon ve tümör süpressör gen promotör CpG adalarında hipermetilasyon şekillerinde olmaktadır. Hipometilasyon proto-onkogen aktivasyonuna neden olarak kanser başlanması ve gelişimine katkıda bulunmaktadır. Genom çapında hipometilasyon düzeyi kanser şiddeti ile doğru orantılıdır. Meme kanseri üzerine yapılan bir çalışmada hipometilasyon düzeyi ve hastalık evresi, tümör çapı ve şiddeti arasında anlamlı bir korelasyon bildirilmiştir (Soares ve ark. 1999; Costello ve Plass, 2001). Bununla birlikte bazı yazarlar genom çapında hipometilasyon ile onkogen aktivasyonunu muhtemel olmayan veya yetersiz bir teori olarak tanımlamıştır (Esteller, 2002). Kanser başlangıcı ve gelişiminde gözlenen hipometilasyonun bir diğer sonucu DNA instabilitesidir. DNA metil donörü SAM'ın kaynağı olan folatın eksikliği hipometilasyona neden olmaktadır. Hipometile DNA zinciri kırıklara zemin oluşturur (Clark ve Melki, 2002).

Promotör bölgelerdeki CpG adalarının metilasyonu bir tümör süpresörün her iki allelini de inaktive edebilir (Costello ve Plass, 2001). Bir kanser hücresinde birden fazla tümör süpresör gen aynı anda hipermetile olabilir. Hücre döngüsünün regülasyonu, DNA tamiri, ilaç direnci, detoksifikasyon, farklılaşma, apoptoz, anjiyogenez ve metastazla alakalı genlerin hipermetilasyonu kanser gelişimi ile sonuçlanabilmektedir. (Costello ve Plass 2001).

2.4.3. DNA Metilasyonunun Mutajenik Etkisi

CpG dinükleotidlerindeki 5-metil sitozin spontane deaminasyon ile timin bazına veya enzimatik deaminasyon ile urasil bazına dönüşebilmektedir (Şekil 2.6). Sitozin timin transversiyonu ekzojenik faktörlerden ziyade endojenik mutajenik süreçler sonucunda oluşmaktadır. Sitozin bazının metilasyonu G-A transisyon mutasyonunu 12-42 kat arttırmaktadır. 5-metil sitozinin deaminasyonunun yanı sıra DNA tamir mekanizmasının etkinliği de bu mutasyonun frekansı için önemlidir. 5-metil sitozinin deaminasyonundan kaynaklanan G:T hatalı eşleşmeleri G:U hatalı eşleşmelerinden daha zor tamir edilir çünkü urasilin aksine timin normal bir DNA bileşenidir. Sitozinin urasile enzimatik deaminasyonu metilazlar tarafından S-adenozil metioninin sınırlı bulunduğu koşullarda meydana gelir (Gonzalگو ve Jones, 1997).



Şekil 2.6. DNA metilasyonunun mutajenik etkisi. a- 5-metil sitozinin spontane deaminasyon ile timine dönüşümü. b- Sitozinin enzim aracılıklı urasile deaminasyonu (Gonzalگو ve Jones, 1997'den).

2.4.4. DNA Metilasyonunun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

DNA metilasyon paternlerinin saptanmasında kullanılan metodlar kabaca 3'e ayrılmaktadır. (i) Bisülfite modifikasyonu temelli metodlar, (ii) Restriksiyon enzim temelli yöntemler ve (iii) Metile DNA'ya bağlanan bir protein alt birim kullanılarak metile DNA fragmentlerinin alıkonmasına dayanan metodlar.

2.4.4.1. Bisülfite Modifikasyonu Temelli Metodlar

2.4.4.1.1. Bisülfite Modifikasyonu

Sodyum bisülfite metodu genomik DNA'daki 5-metil sitozinlerin analizi için en yaygın olarak kullanılan metoddur (Boyd ve Zon, 2004). Nükleik asitlerdeki sitozin bazını deamine etme özelliğine sahip olan bisülfite, 5-metil sitozini değiştirememektedir (Hayatsu ve ark., 2008). Bu deaminasyon sitozini urasile çevirir ve izleyen PCR amplifikasyonu esnasında urasil timine değişir. Modifiye sitozin bisülfite varlığında PCR sonrası değişmeden kalır (Clark ve ark., 2006). Metilasyon spesifik PCR (MSP) bisülfite reaksiyonundan sonra metile bölgelere spesifik primerler ile yapılan ve yalnız bu bölgeleri amplifiye eden duyarlı bir metoddur.

Bisülfite dizileme DNA'nın bisülfite ile modifikasyonundan sonra modifiye DNA ya özgü primerler kullanılarak DNA dizi analizinin yapılmasıdır. Metilasyon için bazçifti düzeyinde kantitatif bilgi sağlamaktadır ve "golden standart" olarak nitelendirilmektedir (Eckhardt ve ark. 2006).

MSP (Metilasyon Spesifik PCR) genomik DNA'nın bisülfite modifikasyonunu takiben değişmiş diziye özgü PCR ürünleri elektroforetik yöntemlerle değerlendirilir. Hızlı ve duyarlı bir tekniktir fakat nicelikten çok niteliksel bilgi verir (Herman ve ark. 1996).

COBRA (Combined Bisulphite Restriction Analysis) Bisülfite ile modifiye edilen ve uygun primerlerle amplifiye edilen DNA'nın yalnızca anmetile CpG bölgelerini kesen *BstUI* enzimi ile kesilmesini takiben kesilen ve kesilmeyen DNA oranının southern blot yöntemi ile saptanmasına dayanır. Metilasyon düzeyi için kantitatif bilgi vermektedir (Xiong ve Laird, 1997).

2.4.4.2. Restriksiyon Enzim Temelli Metodlar

DMH (Differential Methylation Hybridization) yönteminde MseI ile parçalara ayrılmış genomik DNA'ya adaptör oligonükleotidleri bağlanır. Daha sonra metilasyona

duyarlı restriksiyon enzimler (*BstUI* veya *McrBC* gibi) ile kesime tabi tutulur. Kesilmeyen DNA PCR ile amplifiye edilir ve mikroçipler üzerine hibridize edilir. Bu yöntem metilasyon farklılıklarının referans bir örnek ile karşılaştırılması için kullanılmaktadır (Huang ve ark. 1999).

HELP (*HpaII* tiny fragment Enrichment by Ligation mediated PCR) yönteminde genomik DNA *HpaII* ve onun metilasyona duyarlı olmayan izoşizomeri *MspI* ile kesimi ve amplifiye edilmiş kesim ürünlerinin mikroarray yöntemi ile karşılaştırılması ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntem DNA metilasyonunu hem genom içi hem de genomlar arası karşılaştırılmasını sağlar ve kantitatif bir metoddur (Khulan ve ark., 2006).

2.4.4.3. Metile DNA'ya Bağlanan Bir Protein Alt Birim Kullanılarak Metile DNA Fragmentlerinin Alınmasına Dayanan Metodlar

MIRA (Methylated CpG Island Recovery Assay, Metile CpG adası tayini) yöntemi, bir metile CpG bağlanma kompleksi olan MBD2B ve MBD3L1 proteinlerinin metile DNA'ya bağlanmasının ardından DNA'nın *MseI* enzimi ile fragmente edilmesi ve oluşan uçların mikroarraya bağlanarak analiz edilmesi metodudur. Bu metod tüm genomun metilasyon profilini saptamaya yönelik bir potansiyele sahip bir metod olma özelliğini taşımaktadır (Rauch ve Pfeifer, 2010).

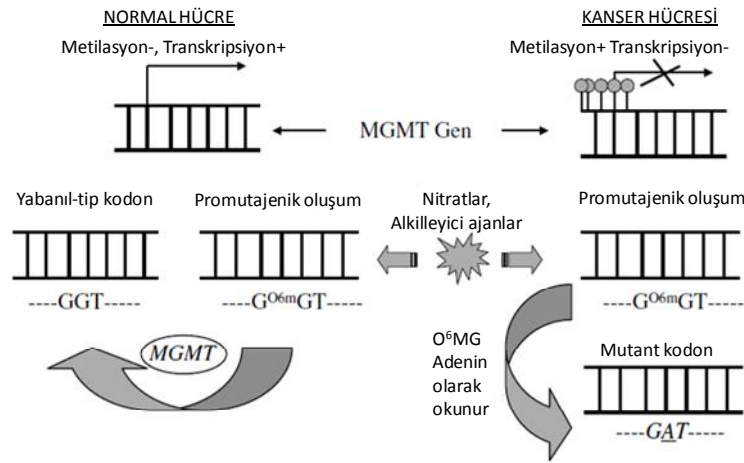
MeDIP (Methylated DNA Immuno Precipitation, Metile DNA immüno presipitasyonu) 5-metil-sitozini tanıyan bir monoklonal antikorun kullanıldığı bir alıkoyma metodudur. Araştırmaların sonuçları bu metodun tüm genom mikroarray ile birleştirildiğinde tüm genomun metilasyon profilinin saptanması için çok güçlü bir metod olacağı yönündedir (Zilberman ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2006).

2.5. Tez Kapsamında Promotör Hipermetilasyonu Araştırılan Tümör Süpresör Genler

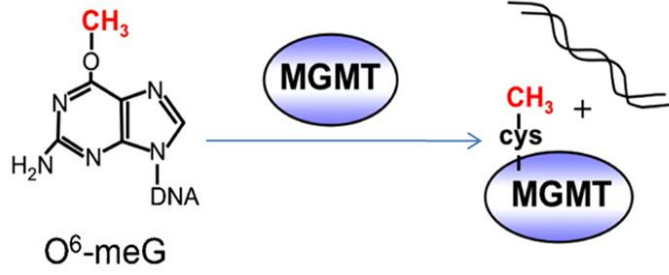
2.5.1. MGMT

Hücre bölünme sürecinde genomun kararlılığı ve bütünlüğü DNA tamir genleri tarafından korunur ve bu genlerdeki genetik değişimler diğer genlerin fonksiyonlarını etkiler ve mutasyon hızını arttırlar (Zhong ve ark., 2010). DNA tamiri konusunda en büyük ilgi hatalı eşleşme, rekombinasyon ve baz ekzisyon tamir mekanizmalarına yönelmiş durumdadır. Bu mekanizmalar insan kanserlerinin başlama ve ilerlemesinde

açık bir öneme sahip olmakla birlikte daha az çalışılmış önemli mekanizmalardan biri de DNA'nın alkilleyici ajanların tehdidinden korunmasıdır (Esteller ve Herman 2004). Bu ajanların varlığında DNA'daki guanin bazının O⁶ pozisyonundan alkillenmesi mutasyonların oluşumu ve dolayısıyla kanser açısından kritik bir olaydır (Sakumi ve ark., 1997). O⁶-alkil guanin (çoğunlukla O⁶-metil guanin şeklinde oluşur) replikasyon esnasında timinle eşleşir ve guanin-sitozin baz çiftinin adenin-timin baz çiftine dönüşümüne neden olur (Şekil 2.7) (Zhong ve ark., 2010). Ayrıca bazı O⁶-alkil guanin DNA nükleotidleri (özellikle O⁶-kloroguanin) karşılındakidaki sitozin bazı ile çapraz bağlar kurarak replikasyonu bloke edebilirler (Esteller ve Herman 2004). Bu etkileri ortadan kaldırmak için organizmalar DNA'da oluşan O⁶-alkilguaninleri tamir eden bir mekanizmaya sahiptir. O⁶-metil guanin DNA metiltransferaz enzimi (MGMT) O⁶-alkil guaninden alkil grupların transferi ve daha az sıklıkta metile olan O⁴-metil timinin tek basamaklı bir reaksiyonla tamirini katalizler (Sekiguchi ve ark., 1996). Bu transfer MGMT'yi geri dönüşümsüz olarak inaktive eder. Tamirden sonra alkillenmiş MGMT DNA'dan ayrılır, übikütinlenir ve parçalanır (Şekil 2.8) (Srivengupal ve ark., 1996).



Şekil 2.7 MGMT geninin aktif olduğu durumda promutajenik oluşumları engellemesi (solda) ve alkilleyici ajanları uzaklaştıramadığı hipermetile durumda G:A transisyonunun oluşumu.



Şekil 2.8 DNA'daki metile bazların tamiri. Basit metilleyici ajanlara maruz kalma çift zincirli DNA'da O⁶-metilguanin (O⁶meG) ve 3-metil adenin (3meA) oluşumuna neden olurken, tek zincirli DNA'da 1-metiladenin (1meA) ve 3-metilsitozin (3meC) oluşumuna neden olmaktadır. O⁶meG, metil grubunun enzimin aktif merkezindeki Cys aminoasitine transfer edilerek, MGMT tarafından doğrudan demetile edilir (Sedgwick ve ark., 2007, değiştirildi).

MGMT geninin insan genomundaki lokalizasyonu 1992 yılında Natarajan ve ark. tarafından in situ hibridizasyon yöntemi ile 10q26 olarak bildirilmiştir (Natarajan ve ark., 1992). MGMT geni yaklaşık olarak 300kb büyüklüğündedir ve 5 ekzon içermektedir. MGMT mRNA'sı 866bp büyüklüğündedir ve 270 amino asitlik bir protein kodlamaktadır (Esteller ve Herman, 2004). MGMT gen promotörü TATA ve CAAT kutularından yoksundur ve guanin ve sitozince zengin bir CpG adası içermektedir (Takai ve Jones, 2002). Maksimal aktiviteye sahip promotör genin 5' ucunda transkripsiyon başlama bölgesinden 1kb upstream ve 200kb downstream arasında yer almaktadır. Promotör, bir minimal promotör, enhanser, glikokortikoid responsif elementler ve çeşitli transkripsiyon faktör bağlanma bölgeleri içermektedir (Harris ve ark., 1991; 1994).

MGMT ekspresyonu hem normal dokularda hem de tümör hücrelerinde çok değişkendir. İnsan tümör hücre hatlarının %20'si MGMT ekspresyonundan yoksundur. MGMT ekspresyonundan yoksun bu hücre hatlarında hiçbir delesyon veya büyük çapta yeniden düzenlenme gözlenmemiştir. MGMT promotörü ile ilgili yapılan bu çalışmalarda promotöre bağlanan faktörlerin etkisinin olmadığı ve gen susturulmasının cis-elementlerin CpG metilasyonu ya da kromatin değişimi gibi mekanizmalar sonucu olacağı ileri sürülmüştür (Bhakat ve Mitra, 2000). MGMT promotör bölgesi sıkı sarılmış heterokromatin içerir ve MGMT inaktif hücrelerde ekzojen nükleazlar ve SP1 transkripsiyon faktörlerinin bölgeye ulaşması çok zordur. Aksine MGMT eksprese eden hücrelerde promotör açık bir kromatin içerir ve nükleozom bulundurmaz (Costello ve

ark 1994a, 1994b; Pieper ve ark., 1996; Patel ve ark 1997). MGMT promotöründeki CpG adacıkları yaklaşık 780bç uzunluktadır ve 97 adet CpG dinükleotid içerir. MGMT'nin transkripsiyonel olarak inaktif olduğu 20 den fazla hücre hattındaki her bir CpG'nin kesin metilasyon düzeyi bildirilmiştir. Bu rapora göre ada iki hipermetilasyon bölgesine ayrılmaktadır (Qian ve Brent, 1997; Wats ve ark., 1997; Nakagawachi ve ark., 2003). Lusiferaz deneyleri her bir bölgenin hipermetilasyonunun promotör aktivitesini baskılamak için yeterli olduğunu göstermiştir (Nakagawachi ve ark., 2003). Bununla birlikte hücre hatları içinde DNA metilasyon düzeyi tamamen metile CpG adaları ve gen inaktivasyonunu etkilemeyen hipometilasyon içeren varyantlar gözlenmiştir.

2.5.2. HIC1

HIC-1 (Hypermethylated in cancer 1) 17. Kromozomun kısa kolunda (17p13.3) lokalize ve insan tümörlerinin çoğunda hipermetile veya delesif olan bir tümör süpresördür (Pinte ve ark, 2004). 1996 yılında Phillips ve ark., ilk olarak over kanserinde kromozom 17'nin allelik kaybını bildirmişlerdir. 1995 yılında Walles ve ark. HIC-1'i P53 tarafından aktive edilen 17p13.3 de yerleşik bir aday tümör süpresör olarak tanımlamışlardır.

HIC-1 geni 4589bç büyüklüğünde iki ekzona sahip bir gendir. İlk ekzon alternatif formlara sahipken ikinci ekzon değişmezdir ve 3' transle olmayan bölge tarafından izlenir (Carter ve ark. 2000; Guerardel ve ark., 2001). İnsan HIC-1 geni üç promotöre sahiptir. Her bir promotör farklı alternatif kesim varyantları oluşturmaktadır. İlk varyant olan ekzon1a kodlama yapmaz ve guanin ve sitozince zengin P1 promotörü ile başlar. Ekzon1b TATA promotör olarak adlandırılan P0 ile başlar ve kodlama yapar. Ekzon 1c ve internal kesim ile oluşan ekzonlar olan ekzon 1d ve ekzon 1e guanin ve sitozince zengin üçüncü promotör olan P2 ile transkribe olurlar (Şekil 2.9). P2 promotör ile başlayan transkriptler yalnızca hassas RT-PCR analizleri ile saptanabilirken 1a ve 1b transkriptleri nothern blot analizler ile saptanabilirler. Normal dokularda transkripsiyonu P53 ile düzenlenen 1a transkripti daha fazla miktarda bulunmaktadır (Pinte ve ark., 2004; Carter ve ark., 2000; Guerardel ve ark., 2001).

HIC-1 proteini, 733 amino asit büyüklüğünde ve 76468 Da'luk sekans spesifik bir transkripsiyonel represördür. Üç ana fonksiyonel alt birim içerir:

i) N terminal BTB/POZ domeini: 120 amino asit büyüklüğündedir. Protein-protein etkileşimlerinde direk veya indirekt (konformasyonel etkilerle) rol alan bir

dimerizasyon domeinidir. Bu bölge aynı zamanda otonom transkripsiyonel represyon bölgesidir.

ii) C-terminal DNA bağlama alt birimi: dört adet sekans spesifik DNA bağlanma özelliğinde çinko parmak (zinc finger) motifi içerir. HiRE (HIC1 responsive element) olarak adlandırılan DNA dizilerine bağlanır.

iii) HIC1 merkezi bölgesi: İkinci otonomal transkripsiyon bölgesini içerir.

HIC1 hedef genleri:

HIC1'in hedef genlerinden olan SIRT1 geni hücrel regülasyonda görev alan proteinlerin deasetilasyonunda rol alır. Promotörünün 5' ucunda iki adet HiRE bulunmaktadır. İkinci HIC1 hedef geni embriyonel dönemde kan damarlarının gelişmesi ve tümör anjiyogenejinde anahtar rol oynayan FGF-BP1 (Fibroblast Growth Factor Binding Protein 1) proteinidir. Sinir hücrelerinin düzenli gelişiminde rol alan bir transkripsiyon faktörü olan Atonal Homolog 1 (Atoh1/Math1) promötör bölgesinde iki adet HiRE bulundurmaktadır.

2.5.2.1. Kanserlerde HIC1 İnaktivasyonu

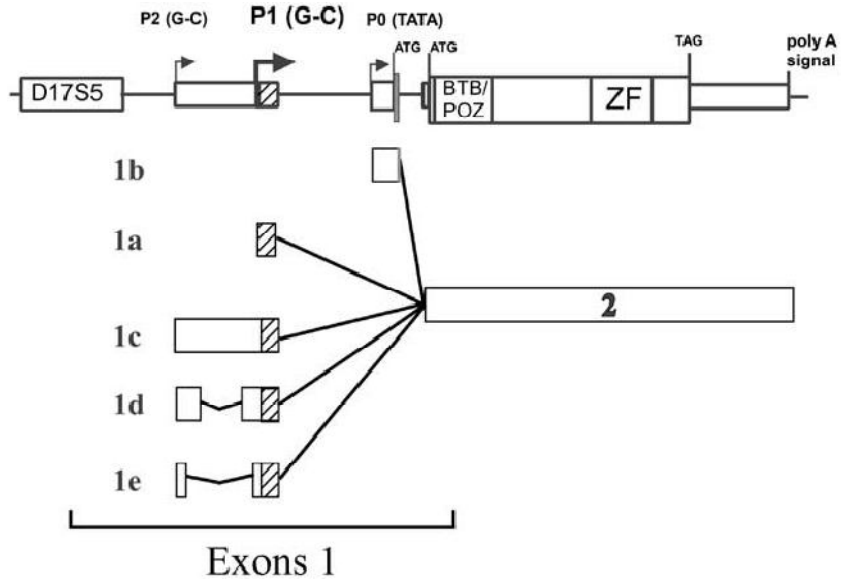
HIC1'in tümör süpresör gen olarak kabulünü takiben bu genin epigenetik inaktivasyonu prostat kanseri (Morton ve ark., 1996), akciğer kanseri (Eguchi ve ark., 1997) ve karaciğer kanseri gibi pek çok kanser türünde belirlenmiştir. HIC1 promotör hipermetilasyon düzeyi değişkenlik göstermektedir ve daha yoğun metilasyon düzeyi tümör agresifliğini arttırmakta ve ortalama sağkalım süresini azaltmaktadır (Walles ve ark., 1995) (Nicoll ve ark., 2001) (Hayashi ve ark., 2001) (Rood ve ark., 2002) (Waha ve ark., 2004). HIC1 promotörü ayrıca P53 proteini için bir bağlanma bölgesi içermektedir ve P53'ün bu bölgeye bağlanması HIC1 ekspresyonunu aktive eder (Walles ve ark., 1995).

2.5.3. DAPK1

DAP kinaz geni ilk olarak 1990'lı yılların ortalarında HeLa hücrelerinde interferon (IFN)- γ aracılıklı hücre ölümü için gerekli olan genleri belirlemek için kullanılan bir antisens kütüphanesindeki genetik taramada keşfedildi (Bialik ve Kimchi, 2004, 2006). DAP kinaz geni programlı hücre ölümünün pozitif aracısı olarak fonksiyon gören Ca^{2+} /kalmodülin (CaM) bağımlı bir serin/treonin kinazdır. DAPK

sitoplazmada aktin mikrofilamentlerine bağılı olarak bulunur.

DAPK geni 9q34.1’de lokalizedir. 210kb büyüklüğündedir ve promotöründe bir TATA kutusu bulundurmaktadır. Ekzon 2’nin başlama bölgesinden 1800bç uzakta yerleşmiş bir SP1 ve AP2 bağlanma bölgesi ve CAAT kutusu bulunmaktadır. Genin translasyonel başlama bölgesinin 590 bç üst ucunda 46 CpG dinükleotid içeren bir CpG adası ayrıca bu bölgenin 1000 bç üst tarafında 100 CpG’den oluşan ikinci bir CpG adası bulunmaktadır. Günümüze kadar yapılan çalışmalar 590 bç’deki CpG adasının transkripsiyonel kontroldeki önemine işaret etmektedir (Schneider- Stock ve ark., 2004).



Şekil 2.9 Üç farklı promotör tarafından başlatılan heterojen 5’ uca sahip HIC1 transkriptleri. Çeşitli alternatif ekzon 1 iki kesim varyantı görülmektedir (Pinte ve ark., 2004.)

DAP kinaz protein ailesi, proapoptotik serin/treonin kinazlar ailesinin bir alt ailesidir, 5 üyeden oluşmaktadır. DAPK-1 (kalsiyum kalmodülince serin/treonin protein kinaz), DRP1 (Death associated protein kinase related protein 1), DAPK2 (Death associated protein kinase 2) DIK/ZIP kinaz (DAP like kinaz/zipper interacting protein kinase) ve DRAK1,2 (DAP kinase related apoptosis-inducing kinase 1 and 2). Ailenin tüm üyeleri çoğunlukla N-terminal kinaz domeini ile sınırlı bir dizi homolojisi gösterirler (Schneider- Stock ve ark., 2004).

DAPK1 proteini sitoplazmada aktin mikrofilamentlere bağı olarak bulunur. DAPK1'in apoptotik fonksiyonu sıkı kontrol altındadır. Bir taraftan normal büyüme koşullarında fonksiyonu baskılanırken diğer taraftan uygun apoptotik sinyal varlığında hızla aktive olmaktadır (Shohat ve ark., 2001).

DAPK1 proteininin katalitik alt birimi N-terminalinde bulunmaktadır, 11 alt birimden oluşur ve tipik serin/treonin kinaz yapısına sahiptir. Kinaz domeini kalmodülin regülatör bölge tarafından takip edilir (CaM bağlanma bölgesi). Bu bölge 8 adet ankirin tekrarı ve 2 p-loop motifi tarafından izlenir. P-loop bölgesinden sonra sitoiskelete bağlanma bölgesi ve son olarak C-terminalinde bir ölüm domeini (Death domain) bulunmaktadır (Şekil 2.10) (Cohen ve ark., 1997).

DAPK fonksiyonunun iki regülasyon biçimi vardır. İlki, CaM düzenleyici segment ile yapılmaktadır. Ca^{+2} ile aktive olmuş CaM'in, otoinhibisyon etkisine sahip bu bölgeye bağlanması DAP kinazı aktive eder. İkinci regülasyon biçimi otofosforilasyon şeklindedir. Otofosforilasyon bölgesi CaM düzenleyici segmentin içinde Ser³⁰⁸ olarak haritalanmıştır. Ser³⁰⁸ otofosforilasyonu proteinin kalmodüline olan affinitesini azaltır ve DAPK1'in katalitik etkisini zayıflatır (Shohat ve ark., 2001, Chen ve ark., 2006). DAPK1'in yapısındaki ankirin tekrarları aktin mikrofilamentleri üzerinde kinazın doğru yerleşimi için gereklidir. Ankirin tekrarları; hücre-hücre sinyalizasyonu, hücre iskeleti ile bütünlük sağlama, transkripsiyon ve hücre döngüsünün düzenlenmesi, inflamasyona cevap gibi işlevleri olan birçok farklı proteinde bulunmaktadır. Enzimatik aktiviteleri yoktur ve özgül protein-protein etkileşimine aracılık ederler (Mosavi ve ark., 2004).

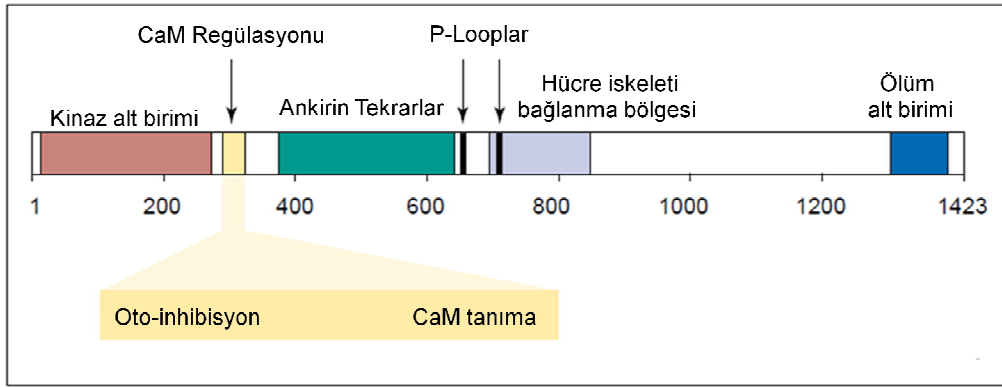
2.5.3.1. DAPK1'in Görevleri

DAPK1, apoptoz, otofaji ve immün cevap gibi farklı hücre fonksiyonlarda görev almaktadır. DAPK ekspresyonu ve apoptotik aktivitesi transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) ve P53'ü aktive eden uyarılar tarafından artırılır. Diğer ölüm sinyalleri E2F ve Myc gibi onkogen ekspresyonları arttığında DAPK1 ekspresyonunu uyarır (Şekil 2.11).

2.5.3.1.1. DAPK1 ve Apoptoz

DAPK1 programlı hücre ölümü olan apoptozda hem dışsal (extrinsic) hem de içsel (intrinsic, mitokondriyel yolak) yollarda işlev görür. DAPK1 başlıca IFN γ aracılıklı apoptozun pozitif düzenleyicisidir ve p53 ve p19^{ARF} bağımlı bir aktivite

gösterir. *In vitro* kinaz deneylerinde DAPK1'in p19^{ARF}'u fosforile edebildiği gösterilmiştir. Myc ve E2F gibi onkogenlerin overekspresyonu DAPK1 ifadesini arttırmaktadır (Şekil 11). Ekstrasellüler ligantların hücre yüzeyi ölüm reseptörlerine bağlanması ile başlayan dış yolda, DAPK1'in FAS reseptörüne FADD/MORT1 ve prokaspaz 8 veya 10'un bağlanması ile oluşan ölüm sinyal kompleksine etki ettiği düşünülmektedir (Voso ve ark 2006). İçsel yolda DAPK1 mitokondriyal TGF-yolağında işlev görmektedir. TGF- β , DAPK1'in ekspresyonunu indüklemektedir.



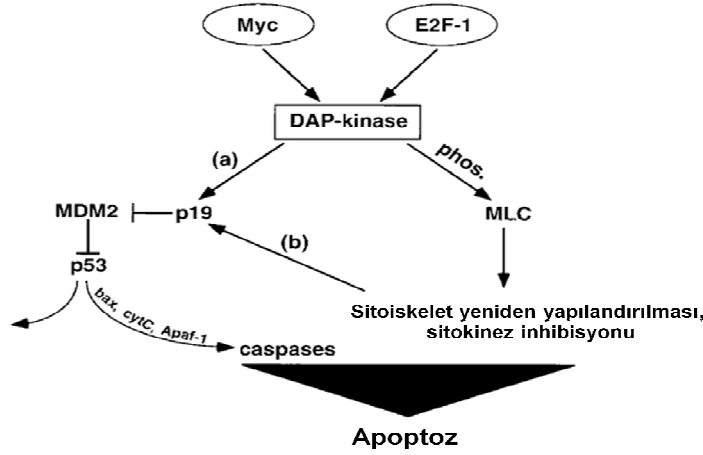
Şekil 2.10 DAPK1 proteininin segmental yapısı. Tüm kalmodulin (CaM) tarafından regüle edilen serin/treonin protein kinazlar gibi 165000 moleküler ağırlığındaki DAPK1 bir çekirdek katalitik kinaz alt birimine (kırmızı) ve bir CaM tanıma ve otoinhibisyon segmentleri içeren CaM regülatör alt birimi (sarı) içermektedir. Katalitik alt birim substrat özgülüğü ve CaM regülasyon alt birimi kinaz aktivitesinin regülasyonundan sorumludur. DAPK1, diğer proteinlerle olan etkileşim ve hücre içindeki lokalizasyonu kontrol eden katalitik olmayan bir dizi alt üniteye de sahiptir. Bu alt birimler, ankirin tekrarları (yeşil), P-Loop'lar (siyah), sitoskelet bağlanma bölgesi (mor) ve ölüm domainidir (mavi). Numaralar aminoasitlere işaret etmektedir. (Van Eldik, 2002).

2.5.3.1.2. DAPK1 ve Otofaji

Otofaji genellikle hücrel açlığa karşılık olarak gelişen protein ve organel sindirimidir. Bazı hücre tiplerinde DAPK1'in aşırı ekspresyonu otofajik veziküllerin gözlenmesine neden olmuştur (Lin, 2009).

2.5.4. SFRP2

Secreted frizzled- related proteinler (SFRPs) Wnt ligantlarının, frizzled (fz) membran reseptörlerini uyarması ile başlayan Wnt sinyal iletim yollarının düzenleyicileridir. Wnt sinyal iletim yolları embriyonik dönemde hücre ömrü, polaritesi ve adezyonundan, tümörigenez ve apoptoza pek çok biyolojik işlemde rol almaktadır (Kikuchi ve Yamamoto, 2008).



Şekil 2.11 Dap-kinaz proteinlerinin apoptozdaki rolü. Artmış Myc ve E2F ekspresyonu hem otofosforilasyon ile Miyozin hafif zinciri ile etkileşime girerek hücre hareketlenmesini engeller. Hem de p19 üzerinden MDM2 yi inaktive ederek p53 ün stabilize olmasını ve apoptozun başlamasını aktive eder.

2.5.4.1. Wnt Sinyal İletim Yolağı

Wnt kısaltması, mutasyonları Wg (Wingless, kanatsız) ve Int fenotipleri ile sonuçlanan deneyler üzerine ilgili yolağa verilen addır (Klaus ve Birchmeier, 2008). Kanatsız (wingless) geni *Drosophila melanogaster*' de ilk olarak kanatları ve halter oluşumunu etkileyen resesif mutasyonlar sonucu bulunan bir genidir. Daha sonra aynı organizmada embriyogenez esnasında fonksiyon gören segment polarite geni olarak tanımlanmıştır. INT genleri omurgalı genleri olarak tanımlanmıştır ve Int-1 geni ve wingless geninin protein dizi benzerlikleri nedeni ile homolog (kökendeş) olduğu ileri sürülmüştür (Logan ve Nusse, 2004; Klaus ve Birchmeier, 2008).

Organizmalarda Wnt/ β -katenin sinyal yolu (canonical signal pathway), hücre polaritesinin sağlanmasında rol oynayan sinyal yolu (non-canonical pathway) ve Wnt/kalsiyum (Ca^{+2}) sinyal yolu olmak üzere üç çeşit Wnt sinyal yolağı bulunmaktadır.

Wnt sinyal yolları, ergin dönemde kendini yenileyen hücrelerin adezyonunda, hedef hücre genlerinin transkripsiyonunun kontrol edilmesinde, embriyonik dönemdeki hücrelerde ise hücre polaritesinin, proliferasyonunun sağlanmasında, farklılaşmada ve hücre göçünde önemli ölçüde rol oynamaktadır (Tanır ve Demirezen, 2009).

2.5.4.2. Wnt Sinyal İletim Yolu Elemanları

Wnt/ β -katenin sinyal yolu (canonical signal pathway) ilgili Wnt ligantının hedef Fz reseptörüne bağlanması ve membranda bulunan düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör bağlantılı proteinlerinden (LRP5 ve LRP6) biri ile kompleks oluşturması ile başlar. Bu etkileşim ilk kararın verilmesini ve sinyalin regülatör sinyal iletim sistemlerinden hangisini kullanacağını belirler. Sürecin sonunda intrasellüler β -katenin stabilize olur. Wnt sinyalinin yokluğunda β -katenin proteozom sistemi ile degrade edilir (Şekil 2.12). Wnt sinyal iletim yolu, Wnt ligant ve reseptörleri, downstream reseptör kompleksi, multiprotein kompleksi, nükleer bileşenler ve hücre dışı Wnt inhibitörlerinden oluşmaktadır.

2.5.4.2.1. Wnt Ligant ve Reseptörleri

2.5.4.2.1.1. Wnt Ligantları

Wnt genleri tarafından kodlanan Wnt protein ailesi üyelerinden her biri, yaklaşık 350 aminoasitten meydana gelmiştir ve 23-25 adet sistein aminoasitine sahiptir. Sahip oldukları bu sistein aminoasitleri (sölenitlerden insana kadar) Wnt proteininin hedef hücre zarı ile etkileşimini sağladığından evrimsel açıdan oldukça iyi korunmuştur. Günümüze kadar 19 Wnt proteini karakterize edilmiştir. Wnt polipeptid zinciri oluştuğundan sonra, N terminalinde bulunan hidrofobik sinyal sekansları ile endoplazmik retikulum (ER)'a gönderilir. Son şeklini almamış olan Wnt, ER'de çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar geçirerek ekzositoz ile hücreler arası boşluğa salınır ve Wnt sinyal yolunda görev alacak hale gelir. Bu modifikasyonlar; glikozilasyon ve lipid modifikasyondur (Coudreuse ve Korswagen, 2007; Tanır ve Demirezen, 2009).

2.5.4.2.1.2. Wnt Reseptörleri

Wnt yolunun reseptörleri hedef hücre zarında bulunan Frizzled (Fz) proteinleri ve düşük yoğunluklu lipoproteinreseptör ilişkili protein 5 ve 6'dır (Low-density lipoprotein receptor-related protein, LRP5/6). Fz proteinlerin hücre dışı sistince zengin

alt birimi ve transmembran alt birimi güçlü bir şekilde korunmuş olmasına rağmen ligant spesifitesi ve fonksiyon olarak değişkenlik göstermektedirler. LRP uzun bir transmembran proteindir ve hücre dışı alt birimi Wnt ile doğrudan bağlanarak Fz reseptör ile üçlü kompleks oluşturmaktadır (Tamai et al., 2000). LRP'nin hücre içi alt birimi aksin proteini ile bağlanmaktadır. Oluşan Fz-Wnt-LRP kompleksi aksini aktive ederek β -katenini multiprotein kompleksinden ayırır ve Wnt hedef genlerinin transkripsiyonu başlar. (Mao ve ark., 2001).

2.5.4.2.2. Downstream Reseptör Kompleksi

Drosophila'da Dsh ve omurgalılarda Dvl genleri sitoplazmik bir fosfoprotein kodlar ve Wnt yolağının pozitif aracıdır. Omurgalılarda 3 homoloğu tanımlanmıştır (DVL1-3). Wnt sinyalinin varlığında Dsh/Dvl kazein kinaz 1'e (CK1) bağlanır. Bu bağlanma β -kateninin serin 45 pozisyonundan fosforile olmasını engeller ve β -katenin stabilizasyonunu sağlayarak yolağı aktive eder.

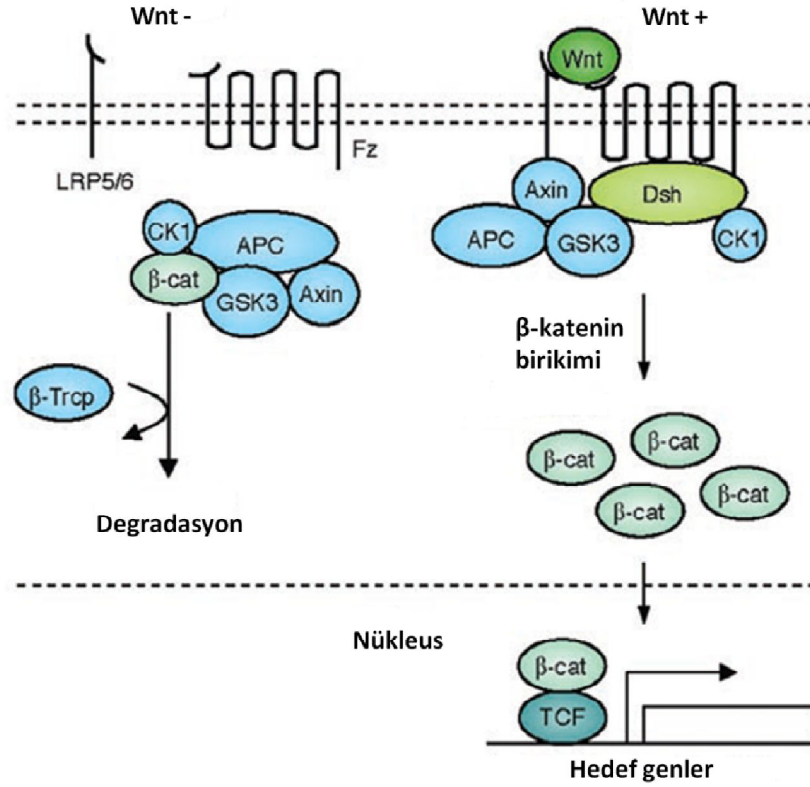
2.5.4.2.3. Multiprotein Kompleksi

β -kateninin stabilizasyonu β -katenin, aksin, APC (adenomatoz poliposis koli) ve GSK-3 β 'dan (Glikojen sentaz kinaz) oluşan bir kompleks tarafından düzenlenir (Schwarz-Romond ve ark., 2002). GSK-3 β Serin treonin protein kinaz ailesinin bir üyesidir ve proteozom degradasyonundan önce β -katenin, aksin ve APC'yi fosforile eder. Aksin Wnt sinyal iletim yolağının negatif regülatörüdür ve protein kompleksini bir arada tutmaktadır. β -katenin, bu sinyal yolunda anahtar rol oynayan sitozolik bir proteindir (Willert ve Nusse, 1998). Fosforillenmeyen β -katenin, proteozomlarda parçalanamaz ve sitozolde birikir. Biriken β -kateninin bir kısmı, çekirdek zarından çekirdeğe girerek, burada bulunan transkripsiyon faktorlerini (TCF/LEF-1) aktive eder ve Wnt sinyal yolunun hedef genlerinin transkripsiyonunu başlatır (Huelsenken ve Behrens, 2002).

2.5.4.2.4. Nükleer Bileşenler

TCF/LEF transkripsiyon faktörleri Wnt sinyal iletiminin nükleer bileşenleridir. Wnt sinyali ile, TCF/LEF, β -katenin, BCL-9, Pygo ve CBP ile kompleks oluşturarak c-myc, siklin D1 matriks metalloproteinazlar gibi hedef genlerin ekspresyonunun başlatır. Wnt sinyalinin yokluğunda TCF/LEF proteinleri, histon deasetilasyonu ve kromatin kondensasyonunu aktive eden TLE1 ve C-terminal bağlanma proteini (CtBP) gibi ko-

represör proteinlerle bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu baskılar (MacDonald ve ark. 2009).



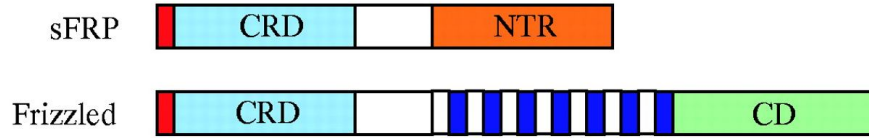
Şekil 2.12 Wnt/β-katenin sinyal iletim yolağının şematik gösterimi. Sol tarafta Wnt ligantının yokluğunda sitozolde aksin, APC, GSK-3, Ck1 ve katenin sitozol kompleksi oluşur. Katenin, GSK3 ve CK1 tarafından fosforillenir ve TrCP aracılığıyla proteozom tarafından degrade edilir. Sağ tarafta, Wnt ligantının varlığında sinyal, Fz reseptör ve LRP5/6 ko-reseptör kompleksi indükler, Ck1 ve GSK3 LRP6'yı fosforile eder ve aksini de içeren protein kompleksi sitozolden hücre membranına transloke olur. Membran üzerinde Fz, aksin ve fosforile LRP5/6'nın bağlanması Dsh proteininin varlığını gerektirir. β- katenin nükleusa geçer, burada LEF ve TCF ile kompleks kurarak hedef genlerin transkripsiyonunu uyarır.

2.5.4.2.5. Hücre Dışı Wnt İnhibitörleri

Wnt inhibitörleri (antagonistleri) iki fonksiyonel sınıfa ayrılabilir: SFRP sınıfı ve Dikkopf sınıfı. SFRP sınıfı, SFRP ailesi, WIF-1 ve Cerberus proteinlerini içerir ve doğrudan Wnt ligantlarına bağlanarak Wnt-reseptör kompleksinin oluşmasını engellerken Dikkopf sınıfı üyeleri Wnt reseptör kompleksinin LRP5/LRP6 bileşenlerine bağlanarak sinyal iletimini inhibe ederler (Kawano ve Kypta, 2003).

2.5.4.2.5.1. SFRP Ailesi

SFRP ailesinin bilinen 6 üyesi mevcuttur. Bu beş SFRP proteini 1'den 5 e kadar numaralandırılarak isimlendirilmiştir. Memelilerde bulunmayan 3 üye ise Sizzled1, Sizzled2 ve Greccent olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 2.13 SFRP proteinleri ve Fz reseptörlerinin şematik gösterimi. SFRP proteinleri Fz reseptörleri ile CRD (sisteince zengin alt birim) altbirimi ile ilişki kurar. NTR: Netrin benzeri alt birim, CD: sitoplazmik alt birim (Kawano ve Kypta, 2003).

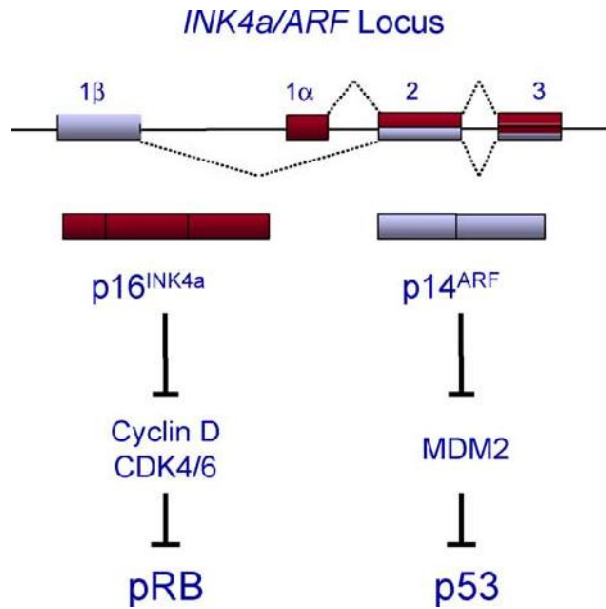
SFRP proteinlerinin N terminalinde CRD (cysteine-rich domein, Sisteince zengin alt birim) ve C terminalinde ise NTR (Netrin benzeri alt ünite) alt birimi bulunmaktadır (Şekil 2.13). CRD alt birimi Fz proteinleri ile %30-50 dizi benzerliğine sahiptir ve 10 korunmuş sistein amino asiti içerir. SFRP'lerin Wnt ligantları ile etkileşerek yolağı inhibe ettikleri görüşü ağır basmaktadır. NTR alt birimi akson yönlendirici protein netrin ile dizi benzerliğine sahiptir. Altı adet korunmuş sistein amino asiti ve bazı doku metalloproteazların doku inhibitörlerinde görülen hidrofobik aminoasitler bu alt birimde gözlenmektedir.

SFRP'ler bir görüşe göre Wnt sinyal aktivitesinin morfojenetik gradientini kontrol etmektedir. SFRP ekspresyonu gelişen organizmalarda Wnt aktivitesini sınırlayarak sınırların belirlenmesini sağlar. Böylece SFRP ekspresyon gradienti Wnt'nin aynı miktarda eksprese edildiği dokularda aktif Wnt protein gradientine neden olmaktadır (Kawano ve Kypta, 2003).

Tüm SFRP genleri farklı kromozomlar üzerinde bulunmaktadır. SFRP2 (SDF-5, sFRP-2, SARP1) geni 4q31.3'de lokalizedir. Yaklaşık 2.2kb büyüklüğünde bir mRNA kodlar. Başlıca Kolon, ince barsak, retina, kalp, beyin ve pankreasta eksprese edilir. SFRP2 proteini 295 amino asitten oluşmaktadır ve 33.5kDa'dur (Jones ve Jomary, 2002).

2.5.5. p16^{INK4a} Geni

p16^{INK4a} proteini (*CDKN2A*) hücre bölünmesinin G1 evresinde CDK4/6 (siklin bağımlı kinaz4 ve 6) ve D tip siklinlerin etkileşimini engelleyen böylece RB proteininin fosforilasyonunu bloke eden bir siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür (CKI) (Chin et al, 1998). *INK4a/ARF* lokusu içinde yerleşmiştir. *INK4a/ARF* lokusu insanlarda kromozom 9p21 bölgesinde bulunmaktadır. Bu lokusun delesyonu glioblastoma, pankreatik adenokarsinom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve mesane kanserini içeren pek çok kanser türünde yüksek frekansla gözlenmektedir (Sharpless, 2005). *INK4a/ARF* lokusu yaklaşık 30kb büyüklüğündedir ve alternatif okuma çerçeveleri ile kodlanan p16 ve ARF (P19) genlerini şifreleyen 4 ekzon içerir. Ekzon 2 ve 3 p16 ve ARF (P19) tarafından paylaşılmaktadır (Şekil 2.14) (Kim ve Sharpless, 2006).

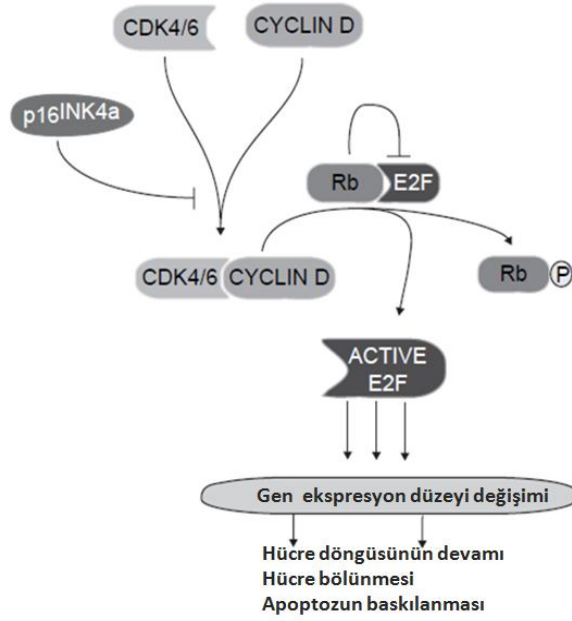


Şekil 2.14 *INK4a/ARF* lokusu, p14^{ARF} (mavi) ve p16^{INK4a} (kırmızı) için iki açık okuma çerçevesi içerir. Her iki proteinin ikinci ve üçüncü ekzonları aynıdır. İlk ekzon alternatif kesim ile oluşur ve iki proteinin farklı fonksiyonlarından sorumludur. p16^{INK4a} RB proteinini fosforile eden CDK/4 ve 6'yı inhibe ederken, p14^{ARF} p53'ün MDM2 aracılıklı degradasyonunu inhibe eder (Sharpless, 2005).

İnsan p16 proteini 156 amino asit içerir (Ruas ve Peters, 1998). Hücrede p16 miktarının artması CDK4-6/p16 kompleksinin oluşumunda artış ve CDK4-6/siklin D kompleksinin oluşumunda azalma ile sonuçlanır. Daha sonra serbest siklin D bir ubiquitin bağımlı proteozom kompleks tarafından parçalanır (Diehl ve ark, 1997). Siklin D'nin ortamdan uzaklaştırılması p27'nin birikmesine neden olur ve böylece hem

CDK2/siklin E hem de CDK2/siklin A bağımlı RB fosforilasyonu engellenir. Sonuç olarak p16 E2F bağımlı transkripsiyonu engeller ve hücre döngüsünü G1/S noktasında bloke eder (Şekil 2.15) (Zhang ve ark., 1999).

Bu güne kadar p16 genindeki 59 CpG adasının baş ve boyun, akciğer kolon ve mesane kanserlerinde p16'nın transkripsiyonunun tamamen durdurulmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (Shapiro ve ark., 1995; Maesawa ve ark., 1996; Costello ve ark., 1996; Rocco ve Sidransky, 2001).



Şekil 2.15 Rb-p16^{INK4a}– Tümör süpressör yolağı hücre bölünmesini uyaran ve apoptozu engellemekten sorumlu E2F ailesi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu inhibe etmektedir (Poulsen ve ark., 2008).

3. MATERYAL ve METOD:

Bu araştırmada kolorektal kanser tanısı almış 93 hastaya ait kolorektal kanser dokularında ve 14 hastaya ait normal kolon mukozasında iki farklı onkogenin yapısal mutasyonu (KRAS ve BRAF onkogenleri) ve 5 farklı tümör süpresör genin (HIC1, MGMT, SFRP2, DAPK1, P16) promotör bölge hipermetilasyon sıklıkları araştırılmıştır. KRAS geninde exon 2'ye ait kodon 12 ve 13 mutasyonları (Çizelge 3.1) revers hibridizasyon strip test tekniği ile saptanmıştır. BRAF geni V600E mutasyonu PCR-RFLP yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Tümör süpresör gen promotör hipermetilasyonları genomik DNA'nın bisülfıt yöntemi ile modifikasyonunu takiben MSP (Metil spesifik PCR) yöntemi ile belirlenmiştir.

3.1. Hasta Grubu

Araştırmaya CÜ Tıp Fakóltesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında kolorektal kanser tanısı almış 93 hasta dahil edildi. Araştırma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakóltesi Bilimsel Araştırmaları Değerlendirme Kurulu tarafından 21.04.2010 tarih ve 2010/29 sayılı karar ile etik ağıdan uygun bulunmuştur. Total genomik DNA izolasyonları ve hedef genler ağısından genotipleme hastalara ait tümör dokularından yapıldı. Kullanılan dokuların 85 tanesi taze tümör dokusu ve 8 tanesi ise formalin ile fiske edilmiş ve parafine gömölerek saklanmış (FFPE) kolorektal kanser dokusu idi. Kolorektal kanser tanısı almış hastalara ait parafin bloklardan, mikroskopik olarak normal olduğu saptanan 14 kolon mukozalarından da DNA izole edilerek çalışmaya eklendi. Taze tümör dokuları DNA izolasyonuna kadar %98'lik etil alkol içerisinde ve -20°C'de saklandı.

3.2. Tümör Dokularından Genomik DNA izolasyonu

Total genomik DNA taze tümör dokularından İnvisorb Spin Blood (İnvitek, Avusturya) kit kullanılarak izole edildi. 50 örneklilik kit içeriği aşağıdaki gibidir:

- 1) Proteinaz K, 1ml(10µg/µl)
- 2) Liziz tamponu (Lysis Buffer A), 15ml
- 3) Bağlama tamponu (Binding Buffer B6), 30ml
- 4) Elüsyon tamponu (Eluotion Buffer D), 15ml
- 5) Yıkama Tamponu I, 30ml (Kullanılmadan önce 30ml %100'lük etil alkol eklenir)

6) Yıkama Tamponu II,18ml (Kullanılmadan önce 42ml %100'lük etil alkol eklenir)

7) 2.0ml'lik toplama tüpleri, 100 adet

8) 1.5ml'lik toplama tüpleri, 50 adet

9) Filtreler, 50 adet

DNA izolasyonu için aşağıdaki protokol izlendi:

1- Doku örneği steril makas ile küçük parçalara ayrıldı. 1.5ml'lik santrifüj tüp ortamında 25µl proteinaz K, 60 µl SDS ve 500µl Tris-EDTA içinde 65 °C'de doku tamamen parçalanana kadar bekletildi.

Çizelge 3.1 Tez kapsamında araştırılan KRAS ve BRAF mutasyonları ve neden olduğu amino asit değişimleri

Onkogen	Kodon	Mutasyon	Amino asit değişimi
KRAS	12	GGT→CTT	Gly→Val
	12	GGT→GAT	Gly→Asp
	12	GGT→GTT	Gly→Leu
	12	GGT→AGT	Gly→Ser
	12	GGT→GCT	Gly→Ala
	12	GGT→ATT, ATC, ATA	Gly→Ile
	12	GGT→TGT	Gly→Cys
	12	GGT→CGT	Gly→Arg
	13	GGC→TGC	Gly→Cys
	13	GGC→GAC	Gly→Asp
BRAF	600	GTG→GAG	Val→Glu

2- İnkübasyon sonrası tüp ortamına 800µl bağlama tamponu (binding buffer B6) eklendi, 10sn vortekslenen tüp içeriği spin kolumn tüplere aktarıldı ve oda sıcaklığında 3dk inkübe edildi.

3- Kolonlar 12000rpm'de 2dk santrifüj edildi.

4- Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarılıp, üzerine 500µl yıkama tamponu 1 (wash buffer I) eklenerek 12000rpm'de 1dk santrifüj edildi.

5- Toplama tüpü tekrar değiştirilip filtre üzerine yıkama tamponu 2 (wash buffer II) eklenerek ve 12000rpm'de 1dk santrifüj edildi.

6- Filtre üçüncü kez 2ml'lik yeni bir toplama tüpüne aktarılıp 14.000rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkama tamponlarından gelen alkolden arındırıldı.

7- Filtre, temiz, hasta ismi ve laboratuvar kodu ile etiketlenmiş 1.5ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Filtre membranının tam ortasına 100µl 56° C' ye ısıtılmış elüsyon tamponu (elution buffer-D) eklenip, oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.

8- Filtreli tüp 10000rpm'de 1 dk santrifüj edilerek filtredeki DNA çözeltisi toplama tüpüne aktarıldı. Elde edilen total genomik DNA'lar -20°C'de çalışılmak üzere muhafaza edildi.

3.3. Parafin Bloklardan DNA İzolasyonu

Parafine gömülü doku örneklerinden kesitler mikrotom cihazı kullanılarak alındı. Kullanılan parafin blokların üzeri bir miktar traşlandı. Daha sonra 10µm kalınlıkta kesitler alındı. Her yeni örnekte bıçak değiştirildi ve mikrotom %70'lik etil alkol ile temizlendi. Alınan doku kesitleri steril 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine koyularak laboratuara ulaştırıldı. Aşağıdaki yöntem kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı.

1. Doku örneğinin üzerine %100'lük ksilol eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
2. Tüpler 13000rpm'de 3 dk çevrildi.
3. Süpernatant atıldı tüplere tekrar %100'lük ksilol eklenerek oda sıcaklığında ikinci kez 30 dk inkübe edildi.
4. Tüpler 13000rpm'de 3 dk çevrildi.
5. Süpernatant atıldı tüplere %100'lük etil alkol eklendi ve 13. 000rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
6. Süpernatant uzaklaştırıldı, tüplere %96'lık etil alkol koyuldu ve 13000rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
7. Süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpler kapakları açık biçimde 37°C'de 15-20 dk bekletilerek alkol uzaklaştırıldı.
8. Bu aşamadan sonra Invisorb Spin Blood (Invitex, Avusturya) kiti kullanılarak bölüm 2.2' de anlatılan DNA izolasyon protokolü izlendi.

3.4. KRAS Mutasyon Analizi

KRAS geni ekzon 12 ve 13 mutasyonlarının analizi revers hibridizasyon strip test tekniği ile yapıldı. Genomik DNA'nın ilgili bölgesi biotin işaretli primerlerin

bulunduğu amplifikasyon karışımı ile amplifiye edildi (Onco colon Strip Assay, Vienna Lab, Avusturya).

Her bir hasta için PCR karışımı aşağıdaki gibidir:

Amplifikasyon Mix A:	15µl
Hot-Start Taq DNA polimeraz (Fermentas.):	0,5 µl
Taq seyreltici tampon:	4.5 µl
Kalıp DNA:	5 µl

PCR koşulları aşağıdaki gibidir:

İlk denatürasyon :	94°C	15dk
Denatürasyon :	94°C	1dk
Bağlanma :	70 °C	50sn + 58°C 50sn
Uzama :	72 °C	1 dk
Son uzama :	72 °C	7dk, 35 döngü

Elde edilen PCR ürünleri amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini saptamak için %2'lik Agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu ve PCR ürünleri strip test tekniğinde değerlendirilmek üzere +4°C'de saklandı.

3.4.1. Agaroz Jel Elektroforezi

1 gr agaroz (**Agarose-Basica LE, Prona**, İspanya) 50ml TAE (Sigma-Aldrich) tamponuna eklendi. Mikrodalga fırında 2 dk kaynatıldı. Düz bir zeminde kalıba döküldü uygun büyüklüklerde tarak takılarak oda sıcaklığında donduruldu. Donmuş Agaroz jelle 2µl yükleme tamponu ile karıştırılmış 4µl PCR ürünü yüklendi. 100 volt'da yarım saat elektroforeze tabi tutuldu. Jel Etidyum bromid solüsyonunda bir süre bekletilip UV ışık altında incelendi ve tümör süpressör genlerin PCR ürünleri kontrol edilinceye kadar +4°C' de bekletildi.

3.5. BRAF V600E Mutasyon Analizi

BRAF geni V600E mutasyonu, restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile yapıldı.

3.5.1. BRAF Geni Amplifikasyonu

BRAF geni 5'-TCA TGA AGA CCT CAC AGT AAA AAT-3' (ileri primer), 5'-TGG ATC CAG ACA ACT GTT CAA-3' (Geri primer) primer dizisi kullanılarak amplifiye edildi. Polimeraz zincir reaksiyonu 2xPCR master mix (Fermentas) kullanılarak yapıldı. PCR 98 bç büyüklüğünde bir DNA fragmenti oluşturmaktadır.

Her bir hasta için PCR karışımı:

2xPCR master mix:	12,5µl
Kalıp DNA :	1 µl
Forward primer :	1 µl
Rewers primer :	1 µl

DNaz RNaz ihtiva etmeyen bidistile su: 9,5 µl şeklinde oluşturuldu.

PCR ürünleri 50bç'lik DNA size marker (Fermentas,) ile %2'lik agaroz jelde ilgili bölgenin amplifikasyonunun yapıldığını doğrulamak üzere elektroforeze tabi tutuldu.

3.5.2. Restriksiyon Kesim

PCR ürünü TspRI (TscA1) (Fermentas) kullanılarak restiksiyon kesime tabi tutuldu (Mohammadi-Asl ve ark., 2009). Her bir PCR ürünü için restriksiyon kesim karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı ve 65°C'de 4-5saat inkübe edilerek restriksiyon kesim yapıldı (Şekil 3.16) .

TspRI:	0.5µl
10X buffer Tango:	1.5µl
DNaz, RNaz ihtiva etmeyen su:	9µl
PCR ürünü:	7µl

Kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde 50bç'lik DNA size marker yardımı ile değerlendirildi. TspRI 600. kodon için yabancı tip alleli kesmektedir. Enzim PCR ürününü sonrası 47 ve 52 bç olmak üzere iki parçaya kesmektedir. Mutant allel kesilmemekte ve 97 bç'lik tek bir bant oluşturmaktadır (Şekil 16).

3.6. Tümör Süpresör Gen Promotör Hipermetilasyon Analizi

İzole edilen DNA örnekleri tümör süpresör gen promotörlerinin hipermetilasyon durumlarının araştırılması için öncelikle bilsülfıt ile modifiye edildi ve saflaştırıldı.

3.6.1. DNA'nın Bisülfıt ile Modifikasyonu ve Saflaştırılması

Bisülfıt modifikasyonu metodu tek iplikçikli DNA' daki bütün Sitozin'leri sodyum bisülfıtın urasil'e deamine etmesi temeline dayanır. Bu sırada 5-MC değişmeden kalır. Daha sonra bu modifiye edilmiş DNA, değiştirilmiş dizi için spesifik olan bir primer seti kullanılarak PCR ile amplifiye edilir. Bu amplifikasyonda tüm urasil'ler (değiştirilmiş Sitozin'ler) Timin olarak amplifiye olurken, yalnızca 5-MC' ler sitozin olarak kalır.

Total genomik DNA'nın bisülfıt ile modifikasyonu Vienna Lab Metil spin kit (Avusturya) kullanılarak yapıldı.

Kit içeriği řu şekildedir:

- Alkilleyici solusyon
- Bisülfıt tüpleri
- Bağlama tamponu
- Yıkama tamponu
- Elüsyon tamponu
- DNA bağlayıcı filtreler

İzole edilen genomik DNA'nın bisülfıt kullanılarak modifikasyonu ve sonrasında saflaştırılması aşağıdaki yöntem izlenerek yapıldı.

- 1- 1,5 ml'lik santrifüj tüpünün içinde 45 µl DNA 5 µl alkilleyici solüsyon ile karıştırıldı, 5 sn vortekslendi.
- 2- 55°C'de 10 dk inkübe edildi.
- 3- Bisülfıt tüplerine 800 µl steril distile su ve 100 µl alkilleyici solüsyon eklendi ve 55°C'ye ısıtıldı.
- 4- İnkübasyonun ardından her bir DNA örneğine 100 µl bisülfıt solüsyonu eklendi pipetaj yapılarak karıştırıldı (bu aşamada vortex kullnilmaz).
- 5- Tüpler 55°C'deki termomikserde, karanlık ortamda 4 saat inkübe edildi.
- 6- İnkübasyonun ardından tüplere 300µl bağlanma tamponu eklendi karıştırıldı.
- 7- Karışım filtreli tüplere aktarıldı.
- 8- 12000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi.

- 9- Süzülen kısım atıldı ve filtre tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- 10- Filtre üzerine 600 µl yıkama tamponu eklendi ve 12000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi.
- 11- Süzülen kısım atıldı ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- 12- Temiz bir tüpte her bir örnek için 300 µl olacak şekilde 1:10 oranında alkilleyici ve etanol karışımı hazırlandı.
- 13- Filtrelerin üzerine 300 µl alkilleyici-etanol karışımı eklendi ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 14- 12000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi.
- 15- Süzülen kısım atıldı filtre tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- 16- Filtre üzerine 600 µl yıkama tamponu eklendi ve 12000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi.
- 17- Filtrenin üzerinde kalan alkolün tamamen uzaklaştırılması için filtre temiz bir 1.5 ml'lik sany-trifüj tüpüne yerleştirilerek 14000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
- 18- Filtre temiz bir 1.5ml'lik santrifüj tüpüne alındı. 30 µl elüsyon tamponu eklendi.
- 19- Filtre oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildi.
- 20- İnkübasyonun ardından filtreli tüp 12000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- 21- Santrifüjün ardından filtre atıldı. Süzülen kısım kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.6.2. MSP ile MGMT, HIC1, DAPK1, SFRP2 ve P16 Genlerinin Amplifikasyonu

Modifiye edilmiş DNA'lardan MGMT, HIC1, DAPK1, SFRP2 ve P16 genlerinin promotör bölgelerinin amplifikasyonu biotin işaretli ve modifiye edilmiş DNA dizisine özgü primerlerin bulunduğu amplifikasyon karışımı ile amplifiye edildi. (Onco colon Strip Assay, Vienna Lab, Avusturya). PCR reaksiyonu,

Amplifikasyon mixB:	10µl
Amplifikasyon mixB2:	5µl
Hot-Start Taq DNA polimeraz:	0.5µl
DNA (bisülfid ile muamele edilmiş):	5µl

şeklinde oluşturuldu.

PCR koşulları,

İlk denatürasyon: 95°C 15dk

Denatürasyon: 95 °C 45sn

Bağlanma: 66 °C 45sn

Uzama: 72 °C 45sn

Son uzama: 72°C 7dk, 45 döngü şeklinde

ayarlandı.

3.7.KRAS mutasyonları ve Tümör Süpresör Hipermetilasyonlarının Revers Hibridizasyon Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Revers-hibridizasyon için ProfiBlot T48 (Tecan) hibridizasyon cihazı kullanıldı. Revers-hibridizasyon, biyotin işaretli primerlerle çoklu (multiplex) polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında oluşan ürünlerin nitrosellüloz membranlar (stripler) üzerindeki kendi komplementer zincirlerine bağlanması ve bir konjugat-substrat reaksiyonu oluşturması esasına dayanan bir tekniktir.

3.7.1. Revers Hibridizasyon Basamakları ve Kullanılan Solüsyonlar

Strip test tekniğininde Revers hibridizasyon 3 temel basamaktan ibarettir;

3.7.1.1. Strip Üzerindeki Problar ve PCR Ürünlerinin Bağlanması-Hibridizasyon

Cihazın örnek yükleme bölgesine (trey) yüklenen 10µl PCR ürünü kitle birlikte sağlanan 10µl DNAT (NaOH içerikli bir denatürasyon solüsyonu) solüsyonu kullanılarak denatüre edildi. Treye strip yerleştirildi. Denatüre PCR ürünü ve strip, cihazın sallanan platformunda, 45°C sıcaklıkta (yaklaşık) 1ml hibridizasyon tamponu ile 20 dk inkübe edilerek strip PCR ürünü hibridizasyonu sağlandı. Hibridizasyon solüsyonu aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı.

3.7.1.2. Yıkama

Hibridizasyon sonrasında ortamda bulunması istenmeyen PCR ürünleri ve non-spesifik bağlanma yapan oligonükleotidler kuvvetli bir yıkayıcı olan yıkama solüsyonu A (1ml) ile 45°C'de 15 dakikalık üç yıkama periyodu ile ortamdan uzaklaştırıldı.

3.7.1.3. Renk Oluşumu

Stripler oda sıcaklığında 1ml konjugat solüsyonu ile 15 dk inkübe edilerek konjugat solüsyonu içinde bulunan streptavidin-alkalan fosfataz, biyotin işaretli hibrit DNA fragmentlerine bağlanması sağlandı.

Konjuat solüsyonunun artıkları daha yumuşak bir yıkama solüsyonu olan yıkama solüsyonu B ile 10, 5 ve 5 dakikalık üçer periyotta temizlendi.

Strip üzerindeki hibridize olmuş bantların görülür hale gelebilmesi için ortama 1ml alkalan fosfatazın substratı olan nitro blue tetrazolium (NBT) ve 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfatdan (BCIP) oluşan renk geliştiricisi (color developer) eklendi, oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona tabi tutuldu. Strip son olarak distile su ile yıkandı, kâğıt havlu ile kurutulduktan sonra değerlendirme tablosuna (Collector) özenle yerleştirildi.

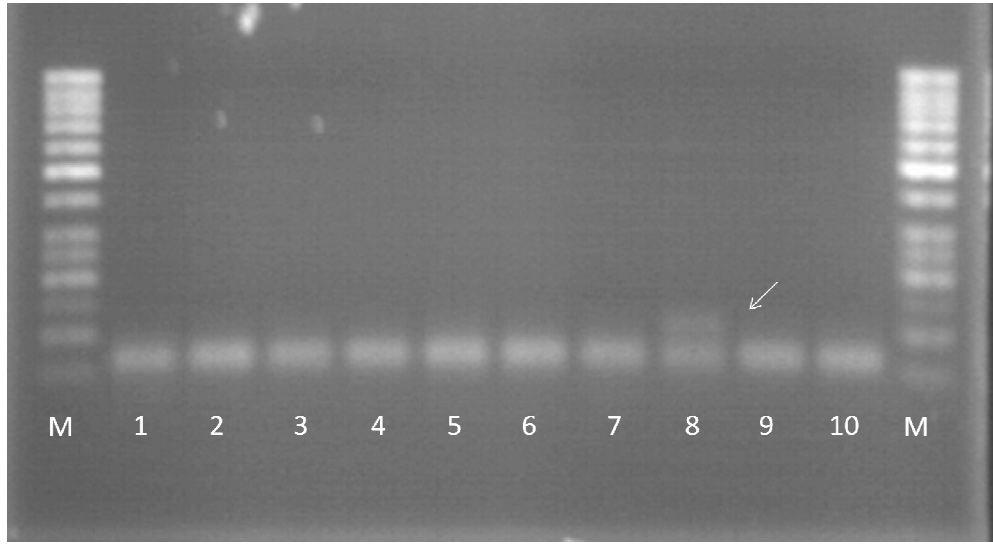
3.8. Striplerin Değerlendirilmesi

Her stripin üst tarafında kırmızı ve alt tarafında yeşil bir belirteç bulunmaktadır. Bunun dışında hibridizasyon sonrası striplerin değerlendirmeye alınabilmesi için 3 adet kontrol bantının oluşmuş olması gerekmektedir. İlk kontrol bandı en üsttedir hibridizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini gösterir. Bunun dışında hem KRAS mutasyon analizi hem de tümör süpressör hipermetilasyon analizi için iki ayrı PCR kontrol bölgesi bulunmaktadır. Hibridizasyon sonrası stripin değerlendirilmeye alınabilmesi için üç kontrol bantının da görülmesi gerekmektedir.

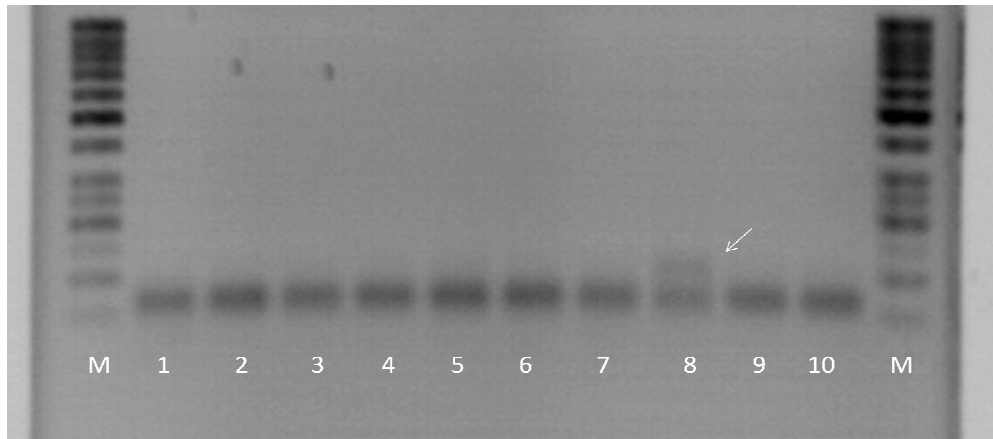
KRAS mutasyonları için strip üzerinde bulunan 10 adet sinyalden hibridizasyon sonrası renk değiştirenler örnekteki mutasyonları işaret etmektedir. Her tümör süpressör gen için iki ayrı metilasyon bantı bulunmaktadır. Bir tümör süpressöre ait tek bir bantın renk değiştirmesi “kısmi metilasyon” her iki bantında renk değiştirmesi “tam metilasyona” işaret eder (Şekil 3.17).

3.9. İstatistik

Çalışma sonrasında elde edilen SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak analiz edildi. Değişkenler arasındaki ilişkiler “Ki-kare” ve “Fisher’s Exact Test” yöntemleri kullanılarak saptandı.



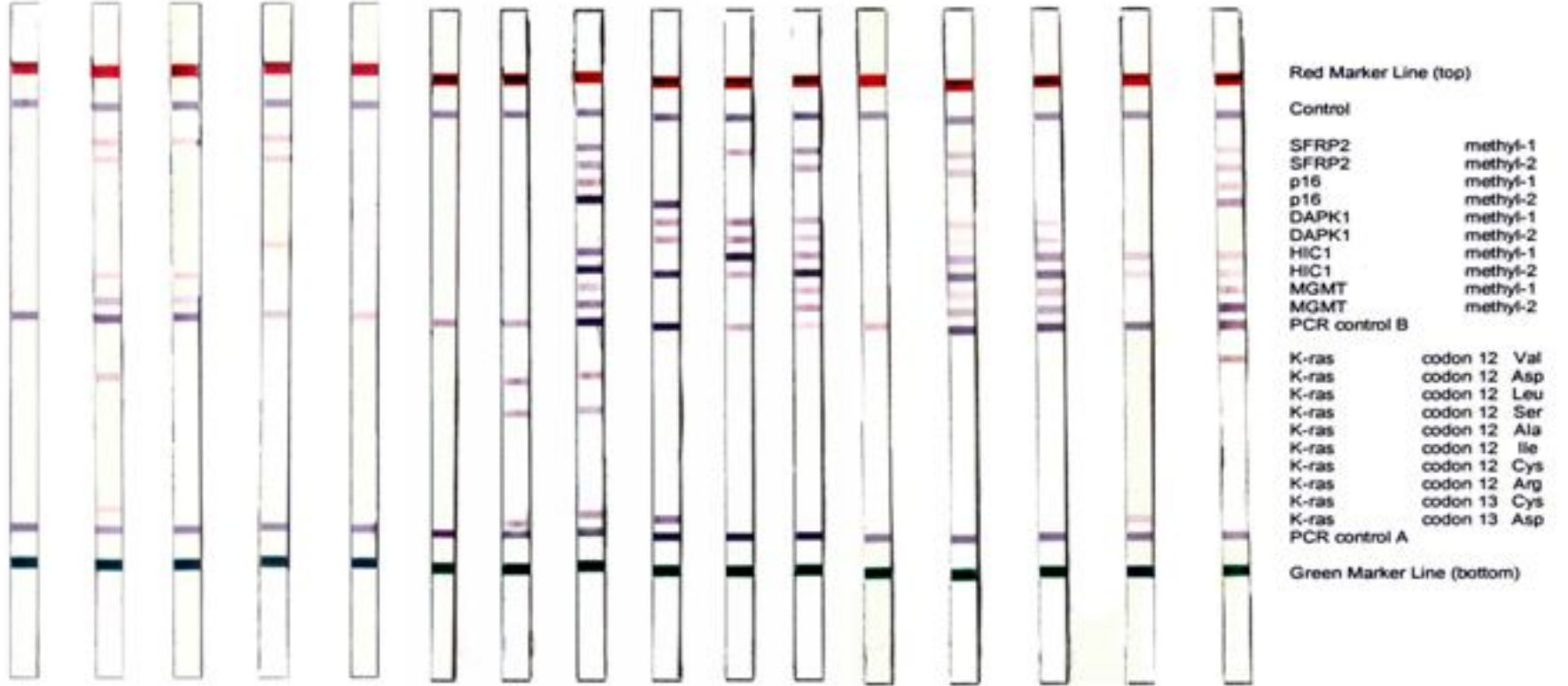
A



B

Şekil 3.16 BRAF kesim ürünlerinin görünümü. A- normal görünüm, B- kontrast görünüm. M: Markır (50 bç, Fermentas), heterozigot mutasyona sahip 8 numara ile gösterilmiş hastada hem normal uzunluktaki PCR ürünü (98 bç) hem de kesim ürünleri (47 ve 52 bç) görülmektedir.

Şekil 3.17 Çalışma grubunda KRAS mutasyonları, tümör süpresör hipermetilasyon profillerinin strip görüntüleri.



4. BULGULAR

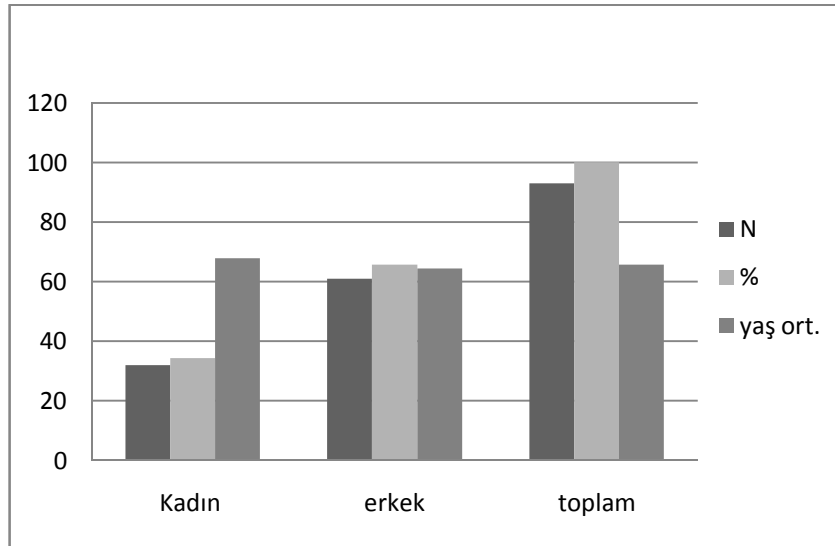
4.1. Çalışma Grubuna Ait Demografik Bulgular

4.1.1. Hasta Yaş ve Cinsiyet Dağılımları

Çalışmaya dahil edilen 93 kolorektal kanser hastasının 32'si kadın 61'i erkekti. Erkeklerde yaş ortalaması 64.30 ± 14.25 , kadınlarda yaş ortalaması 67.77 ± 14.06 ve genel yaş ortalaması 65.59 ± 14.19 idi. Çizelge 4.2 ve Şekil 4.18'de çalışma grubunun cinsiyet ve yaş ortalamaları gösterilmektedir.

Çizelge 4.2. Hasta grubundaki cinsiyet ve yaş dağılımları.

	N	%	Yaş ortalaması
Kadın	32	34.41	67.77 ± 14.06
Erkek	61	65.59	64.30 ± 14.25
Toplam	93	100	65.59 ± 14.19



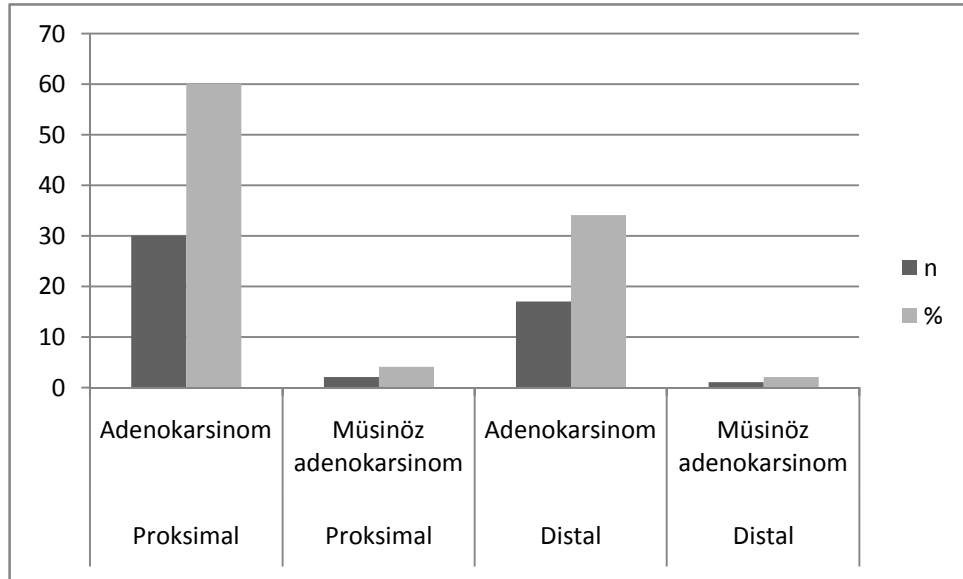
Şekil 4.18 Hasta grubundaki cinsiyet ve yaş dağılımları.

4.1.2. Çalışma Grubunda Bildirilen Kolorektal Kanser Bölgeleri ve Histolojik Tip Dağılımları

Çalışılan 93 adet kolorektal kanser hastasından ulaşılabilenlerin kanser histolojik tipi ve bölgesi Çizelge 4.3 ve Şekil 4.19’ da gösterilmektedir. En sık rastlanan kanser türü proksimal kolondaki adenokarsinomlardı.

Çizelge 4.3 Çalışma grubunda bildirilen kolorektal kanser bölgeleri ve histolojik tip dağılımları.

Bölge	Histolojik tip	n	%
	Adenokarsinom	30	60
Proksimal	Müsinöz adenokarsinom	2	4
	Adenokarsinom	17	34
Distal	Müsinöz adenokarsinom	1	2
Toplam		50	100



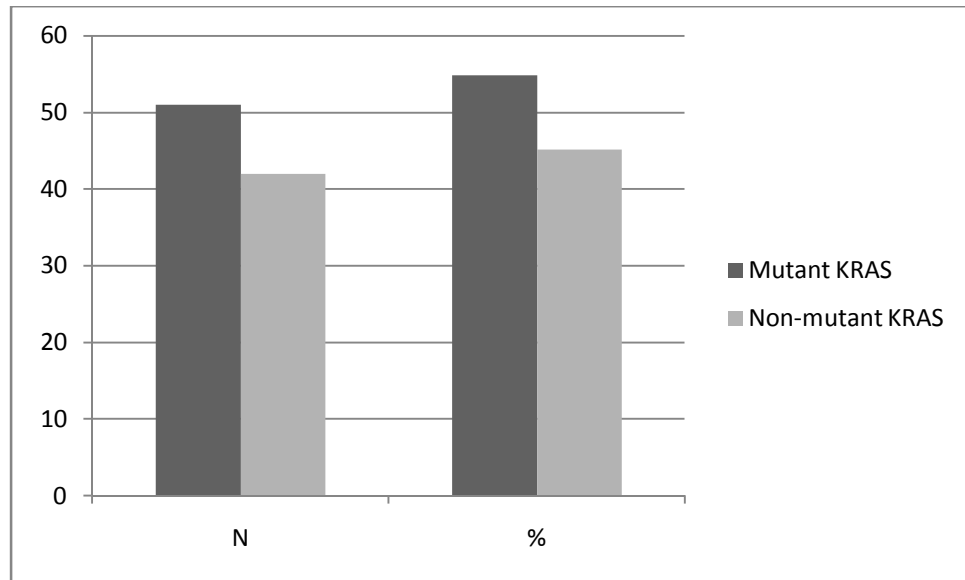
Şekil 4.19 Çalışma grubunda bildirilen kolorektal kanser bölgeleri ve histolojik tip dağılımları

4.2. Çalışma Grubunda Saptanan Mutant KRAS Geni Frekansı

Çalışma grubunun %54.84'ünde (n=51) KRAS mutasyonu saptandı ve %45.16'sında araştırılan KRAS mutasyonları saptanmadı. Çizelge 4.4 ve Şekil 2.20'de hasta grubundaki KRAS mutasyon frekansı görülmektedir.

Çizelge 4.4 Hasta grubundaki KRAS mutasyon frekansı.

	N	%
Mutant KRAS	51	54.84
Non-mutant KRAS	42	45.16
TOPLAM	93	100



Şekil 4.20 Hasta grubundaki KRAS mutasyon frekansı

4.2.1. Saptanan KRAS Mutasyonlarının Dağılımları

Çalışma grubunda saptanan KRAS mutasyon tipleri ve dağılımları Çizelge 4.5'de ve Şekil 4.21'de gösterilmiştir. Hasta grubunda en sık rastlanan mutasyon kodon

12Asp (%13.98; n=13) mutasyonuydu. Bunu kodon 13Asp (%11.83; 11) mutasyonu izledi. 28 hastada yalnız kodon 12 mutasyonları, 11 hastada yalnız kodon 13 mutasyonu, 12 hastada ise kodon 12 ve 13’de birden fazla KRAS mutasyonu saptandı. KRAS geni için araştırılan mutasyonlardan kodon 12 ile mutasyonu hasta grubunda hiç gözlenmedi.

Çizelge 4.5 Saptanan KRAS mutasyonlarının dağılımları.

Mutasyon Bölgesi	Mutasyon Tipi	N	%^a	Genel %^b
Kodon 12	12 Asp	13	25.49	13.98
	12 Cys	5	9.81	5.38
	12 Ala	3	5.88	3.22
	12 Val	6	11.76	6.45
	12 Ser	1	1.96	1.07
	Ara Toplam	28	54.90	30.11
Kodon 13	13 Asp	11	21.57	11.83
	12 Val, 13 Asp	1	1.96	1.07
Birleşik Mutasyonlar	12 Asp, 13 Asp	7	13.73	7.53
	12 Val 12 Asp	2	3.92	2.15
	12 Val, 12 Leu, 13 Asp	1	1.96	1.07
	12 Asp, 13 Asp, 13	1	1.96	1.07

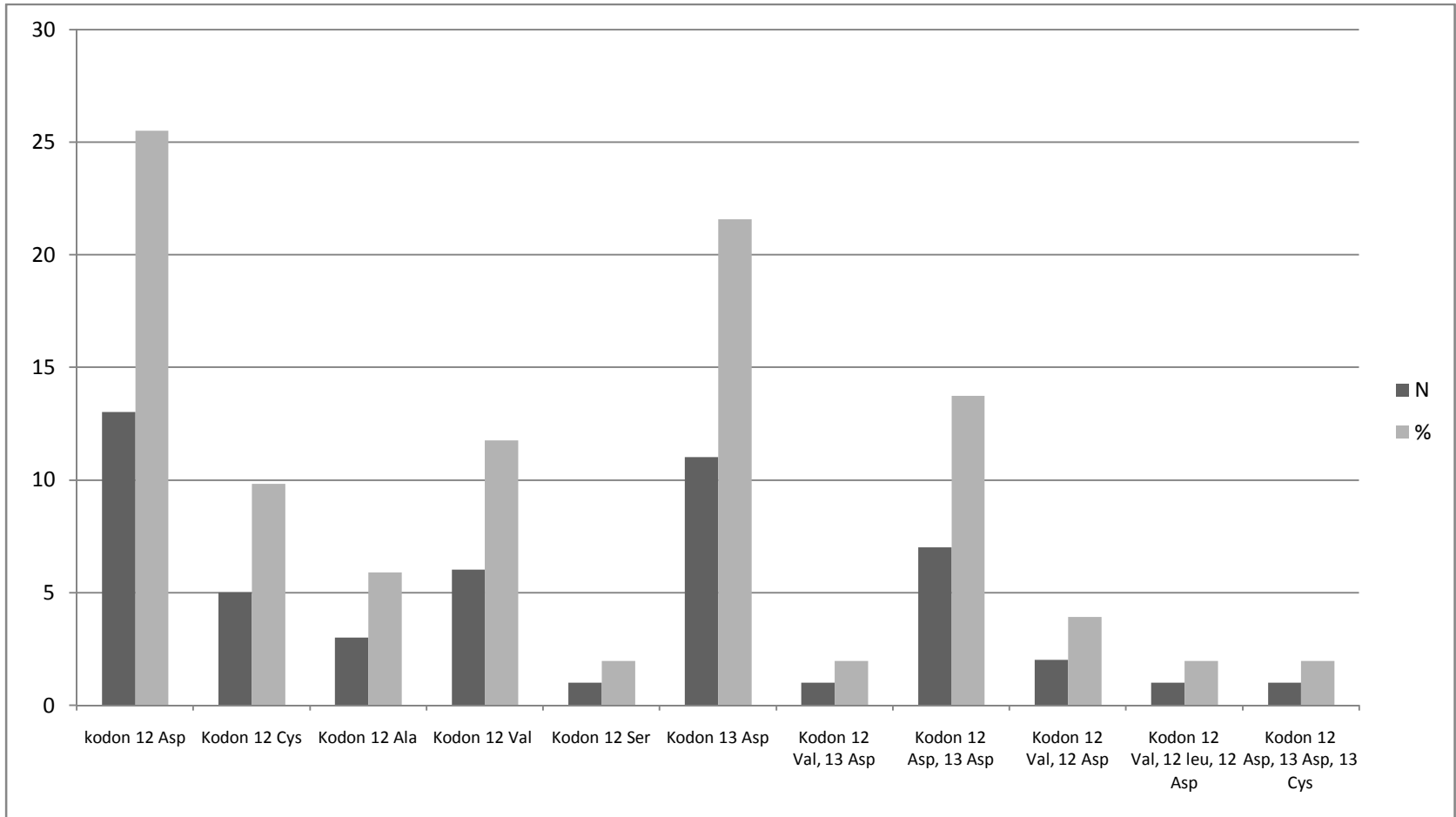
Cys

Ara Toplam	12	23.53	12.90
-------------------	-----------	--------------	--------------

Genel Toplam	93	100	100
---------------------	-----------	------------	------------

^a Mutasyonun KRAS mutasyonları içindeki frekansı

^b Mutasyonun çalışma grubunun tamamındaki frekansı



Şekil 4.21 Saptanan KRAS mutasyonlarının dağılımları

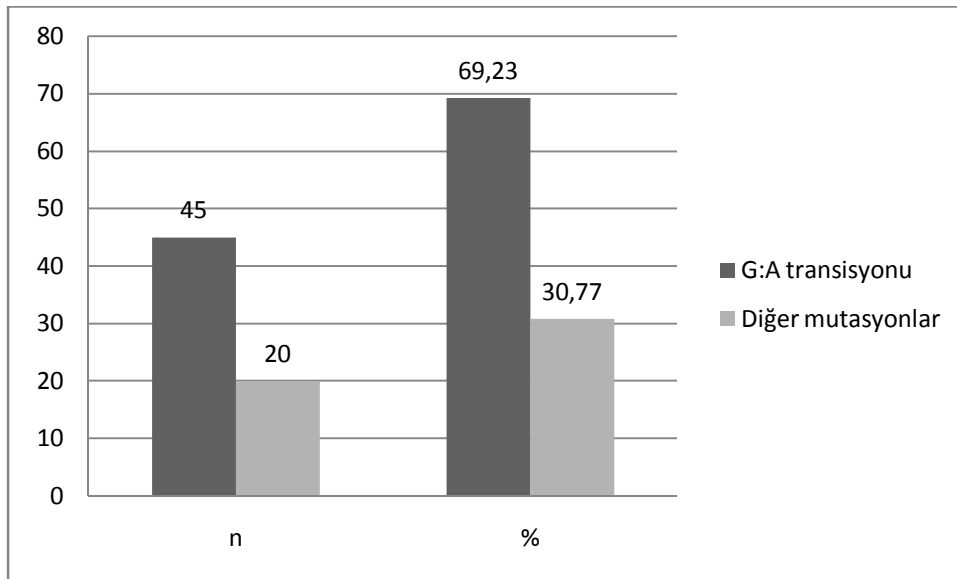
4.2.2. KRAS Geninde Saptanan G:A Transisyon Mutasyonu Frekansı

Çalışma grubunda saptanan KRAS mutasyonları içinde G:A transisyonu içerenlerin sıklığı %69.23 (n= 45) olarak hesaplandı. Diğer baz değişimlerinin sıklığı %30.77 (n=20) olarak hesaplandı. Çizelge 4.6 ve Şekil 4.22'de G:A transisyonu ve diğer mutasyon tiplerinin sıklıkları görülmektedir.

Çizelge 4.6 Çalışılan hasta grubunda mutant KRAS genlerindeki G:A transisyonları ve diğer baz değişimlerinin yüzdeleri.

Mutasyon tipi	N	%
G:A transisyonu*	45	69.23
Diğer mutasyonlar	20	30.77
Toplam	65	100

*Kodon 12 Asp, Kodon 12 Ser, kodon 13 Asp mutasyonlarının toplamı



Şekil 4.22 Çalışılan hasta grubunda KRAS geni G:A transisyonları ve diğer baz değişimlerinin yüzdeleri.

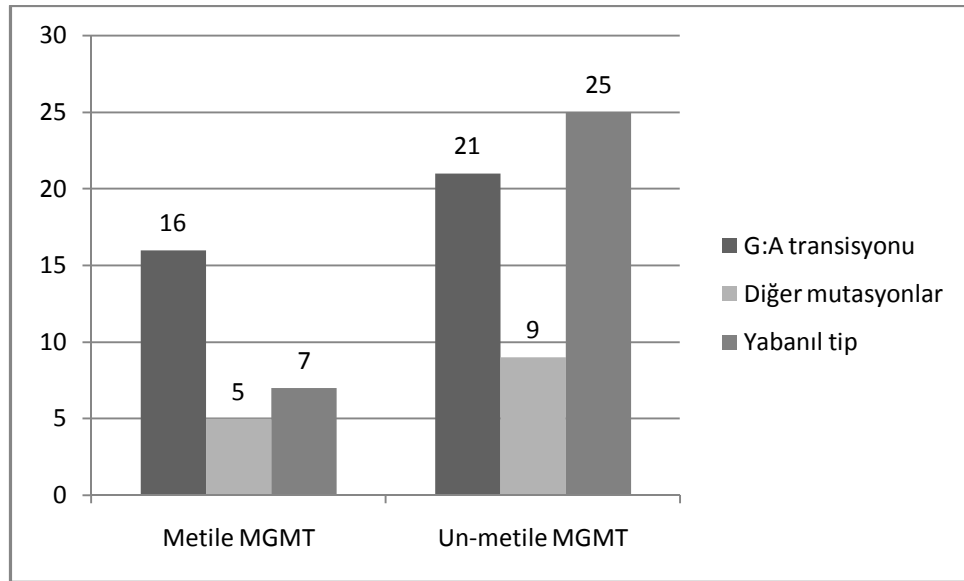
4.2.3. KRAS Geni Mutasyonları ile MGMT Hipermetilasyonunun Karşılaştırılması

Çalışılan hasta grubunda MGMT promotör metilasyonun varlığında G:A transisyon mutasyonları ve diğer mutasyon tiplerinin sıklığı karşılaştırıldı (Çizelge 4.7, Şekil 4.23) MGMT geninde metilasyon olması durumunda G:A transisyon mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

Çizelge 4.7 MGMT promotör metilasyonu varlığında ve yokluğunda G:A transisyon mutasyonları ve diğer mutasyonların sıklıkları.

KRAS Mutasyon tipi	Metile MGMT*	Un-metile MGMT	P
G:A	16	21	
Diğer	5	9	0.886
Yabanıl tip	17	25	

*Tamamen hipermetile ve kısmi metile örnekler aynı anda değerlendirildi.



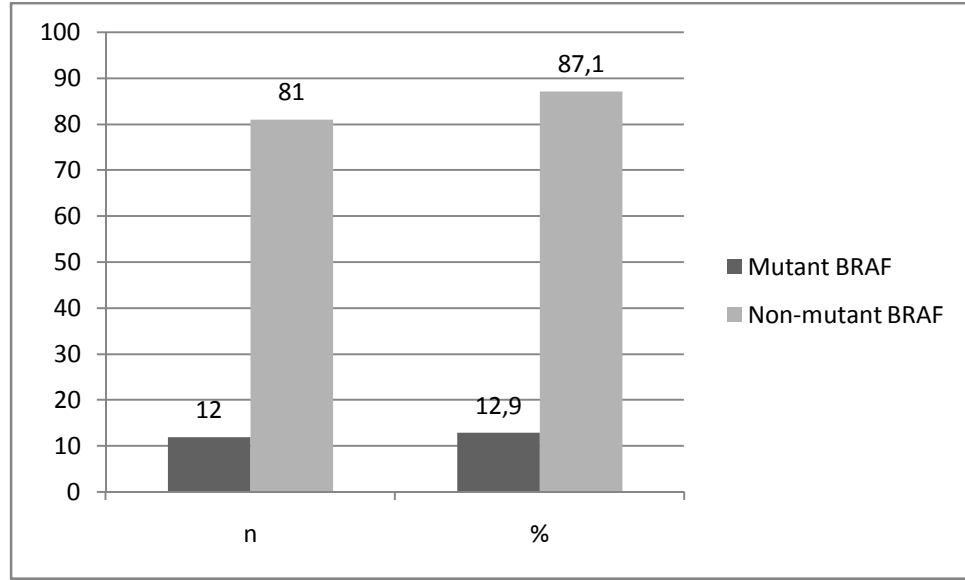
Şekil 4.23 MGMT promotör metilasyonu varlığında ve yokluğunda G:A transisyon mutasyonları ve diğer mutasyonların sıklıkları.

4.3. Çalışma Grubunda Saptanan BRAF Mutasyon Frekansı

Hastaların 12 tanesinde (%12.9) BRAF V600E mutasyonu saptandı, 81 hastanın V600E açısından non-mutant olduğu belirlendi (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.24).

Çizelge 4.8 Çalışma grubunda saptanan BRAF V600E mutasyonunun sıklığı.

	N	%
Mutant BRAF	12	12.9
Non-Mutant BRAF	81	87.1
TOPLAM	93	100



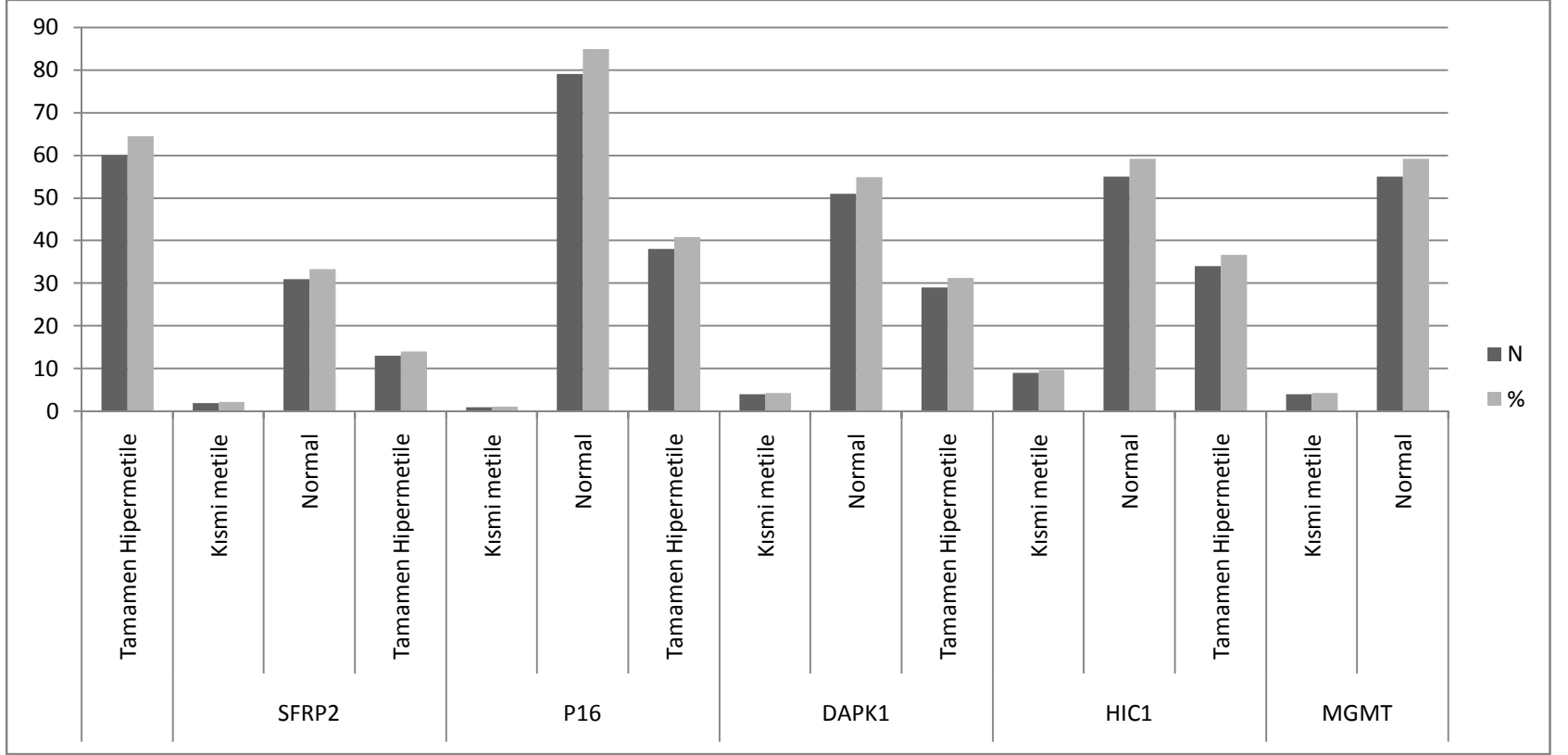
Şekil 4.24 Çalışma grubunda saptanan BRAF V600E mutasyonunun sıklığı

4.4. Çalışılan Tümör Süpresör Genlerin Hipermetilasyon Frekansları

Çalışma grubunda en yüksek hipermetilasyon frekansı SFRP2 geninde saptandı (%64.5, n=60). P16 geninin hipermetilasyon frekansı %14, DAPK1 geninin %40.9, HIC1 geninin %31.2 ve MGMT geninin hipermetilasyon frekansı % 36.6 olarak saptandı (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.25).

Çizelge 4.9 Çalışılan tümör süpresör genlerin hipermetilasyon frekansları.

Tümör Süpresör Gen	Metilasyon Düzeyi	N	%
SFRP2	Tamamen Hipermetile	60	64.5
	Kısmi metile	2	2.2
	Normal	31	33.3
P16	Tamamen Hipermetile	13	14.0
	Kısmi metile	1	1.1
	Normal	79	84.9
DAPK1	Tamamen Hipermetile	38	40.9
	Kısmi metile	4	4.3
	Normal	51	54.8
HIC1	Tamamen Hipermetile	29	31.2
	Kısmi metile	9	9.7
	Normal	55	59.1
MGMT	Tamamen Hipermetile	34	36.6
	Kısmi metile	4	4.3
	Normal	55	59.1



Şekil 4.25 Çalışılan tümör süpresör genlerin hipermetilasyon frekansları.

4.5. Hasta Grubunda KRAS Mutasyonu Varlığı ile Tümör Süpresör Gen Hipermetilasyonu Birliktelikleri

Çalışma grubunda KRAS ile hiçbir tümör süpresör genin hipermetilasyonunun birlikteliği istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sonuçlar Çizelge 4.10'da görülmektedir.

Çizelge 4.10 Hasta grubunda KRAS mutasyonu varlığı ile tümör süpresör gen hipermetilasyonu birliktelikleri.

		KRAS		
		Mutant (n)	Yabanıl (n)	P
P16	Metile	8	6	0.544
	A-metile	43	36	
DAPK1	Metile	27	15	0.073
	A-metile	24	27	
HIC1	Metile	22	16	0.390
	A-metile	29	26	
SFRP2	Metile	33	29	0,414
	A-metile	18	13	

Tümör süpresör genler için kısmi metilasyon ve tam metilasyon sayıları birleştirilmiştir

4.6. Hasta Grubunda BRAF Mutasyonu Varlığı İle Tümör Süpresör Gen Hipermetilasyonu Birliktelikleri

Yapılan analizde mutant BRAF ve hipermetile p16 ve SFRP2 genlerinin birliktelikleri istatistiksel olarak anlamlı sıklıkta gözlemlendi. Bununla birlikte BRAF geni V600E mutasyonu ve HIC1, DAPK1 ve MGMT genlerinin promotör hipermetilasyonlarının birlikteliği istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sonuçlar Çizelge 4.11’de görülmektedir.

Çizelge 4.11 Hasta grubunda BRAF mutasyonu varlığı ile tümör süpresör gen hipermetilasyonu birliktelikleri

		BRAF		
		Mutant (n)	Yabancıl (n)	P
P16	Metile	5	9	
	A-metile	7	72	0.016
SFRP2	Metile	12	50	
	A-metile	0	31	0.005
HIC1	Metile	7	31	
	A-metile	5	50	0.158
DAPK1	Metile	7	35	
	A-metile	5	46	0.158
MGMT	Metile	6	32	
	A-metile	6	49	0.350

Tümör süpresör genler için kısmi metilasyon ve tam metilasyon sayıları birleştirilmiştir.

4.7. Kolorektal Kanser Tanısı Almış Hastaların Normal Kolon Mukoza Örneklerinin Mutasyon ve Hipermetilasyon Frekansları

Kolorektal kanserli bireylere ait normal kolon dokusunda onkogen mutasyonları ve tümör süpressör gen hipermetilasyonu araştırması minimum 30 hasta için planlanmış fakat malzemenin yetersizliğinden dolayı 14 ile sınırlandırılmıştır. 14 adet mikroskobik olarak normal görünümlü dokular 5 kadın, 9 erkek bireye aitti (ortalama yaş 63,89±5.9). Normal dokudaki analizlerin sonuçları Çizelge 4.12’de görülmektedir.

Çizelge 4.12 Kolorektal kanserli hastalara ait 14 adet mikroskobik olarak normal görünümlü kolon mukozasından elde edilmiş DNA’lara ait KRAS BRAF mutasyonları ve tümör süpresör gen promotör hipermetilasyon profilleri.

Gen		n	%
KRAS Kodon 12 Ala		2	14.28
KRAS Kodon 12 Ala		1	7.14
BRAF		0	0
DAPK1	Tamamen metile	4	28.57
	Kısmi metile	1	7.14
SFRP2	Tamamen Metile	7	50
	Kısmi metile	2	14.28
P16	Kısmi metile	1	7.14
HIC1	Tamamen metile	5	35.71
	Tamamen metile	7	50
MGMT	Kısmi metile	2	14.28

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kolorektal kanser kitle tarama programları için gerekli koşullara sahip bir kanser türüdür. Birincisi büyük bir halk sağlığı problemidir ve ikincisi erken dönemde saptanabildiğinde tedavi edilebilir hatta adenomların uzaklaştırılması ile tamamen iyileşme sağlanabilir. Tarama programlarının temel amacı 50 yaşın üstündeki bireylerde sporadik olarak meydana gelen kolorektal kanserlerin saptanmasıdır (Kaz ve Bretnall, 2006).

Kolorektal kanser taraması için çeşitli test ve prosedürler ileri sürülmektedir. En sık kullanılan test dışkıda gizli kan testidir. Bu testin iki yılda bir veya her yıl yapılması durumunda kolorektal kanser riskini yaklaşık %20 oranında düşürdüğü pek çok çalışma ile ispatlanmıştır. Dışkıda gizli kan testinin pozitiflik oranı kanserler için %50-60, 1 cm'den büyük adenomlar için %20-30 civarındadır (Rennert ve ark. 2000; Khuhaprema ve Srivatanakul, 2008). Bu nedenle bu testin büyük adenomları saptamada başarılı olduğu söylenebilir. Dışkıda gizli kan testi hem ucuz hem de kolay uygulanabilen bir testtir. Fakat duyarlılığı ve özgüllüğü sınırlıdır (Khuhaprema ve Srivatanakul, 2008).

Kolonoskopi kolorektal kanser veya onun öncü lezyonlarını (polipler gibi) saptamanın iyi metodudur. Kolonoskopik taramanın teorik avantajları yüksek tanı duyarlılığı ve özgüllüğüdür. Bununla birlikte popülasyon temelli taramalarda kullanımı maliyet ve bu alandaki nitelikli uzmanların azlığı nedeni ile sınırlıdır. Periyodik sigmoidoskopi bazı kuruluşlar tarafından tavsiye edilmesine karşın kolonoskopi ortalama risk altındaki bireyler için nadir olarak yapılmaktadır. Yapılan iki vaka-kontrol çalışmasının sonuçları sigmoidoskopinin kolorektal kanser taramasında 10 yıl süre ile etkili olabileceğini göstermiştir (Kavanagh ve ark., 1998; Newcomp ve ark., 1992; Selby ve ark., 1992).

Kolorektal kanser tarama yöntemlerinin en yeni ve gelişime açık formu genetik testlerdir. Genetik testler kolorektal kanserin ailesel ve sporadik formlarında farklı tarzlarda yürütülmektedir. Kolorektal kanserlerin %3-5'ini oluşturan ailesel kolorektal kanser formları olan FAP, kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser ve hamarmatoz polipozis sendromları (Juvenile polipozis sendromu, Peutz-Jeghers sendromu) için sporadik kolorektal kansere göre daha iyi tanımlanmış metodolojiler mevcuttur. Ailesel kolorektal kanser formları için yapılan genetik testlerde kullanılan DNA periferik kandan elde edilir (Kaz ve Bretnall, 2006). FAP gelişen ailelerin %90'ından fazlası

APC geninde mutasyon bulundurmaktadır (Mori ve ark, 1994). APC mutasyon testinin faydalı olacağı bireyler iki kategoriye ayrılmaktadır: Birincisi klinik olarak FAP veya AFAP' dan şüphelenilen bireyler ve ikincisi ailesinde FAP'lı hastaların bulunduğu bireylerdir. APC testinin duyarlılığı %80 civarındadır bununla birlikte FAP vakalarının %30'u APC geninde de novo mutasyon geliştirmektedir (Kaz ve Bretnall, 2006).

Çoklu adenomatoz polipe sahip ve APC geninde mutasyon bulundurmeyan hastaların önemli bir bölümü MUTYH geninde homozigot mutasyon bulundurmaktadırlar. MUTYH gen ürünü adenin bazını guanine çeviren bir glioksilazdır ve yabancı tip formunda oksidasyon hasarı ile DNA'ya yanlış yerleşmiş adenin bazlarını keser (Lipton ve ark., 2004). Bu nedenle FAP'ı andıran fakat APC'de mutasyon bulundurmeyan bireylerin MUTYH geni için taranması önerilir ve bu sendrom için MUTYH genetik testinin duyarlılığı %98'dir (Venesio ve ark 2004).

HNPCC için DNA yanlış eşleşme tamir proteinlerindeki germline mutasyonlar önemlidir. Bu kanserlerde MLH1 ve MLH2 DNA tamir genleri sık olarak MSH6 ve PMS2 genleri ise daha nadir olarak mutanttır. Bu genlerdeki bozukluklar çoğunlukla mikrosatellit DNA'da meydana gelmektedir ve mikrosatellit kararsızlığı (MSI) olarak adlandırılmaktadır. DNA tamir genlerinden birindeki germline mutasyonlar hayat boyunca yaklaşık %80 kolorektal kanser gelişme riski oluştururlar. Bu risk hangi DNA tamir geninin etkilendiğine de bağlıdır (Hoedema ve ark., 2003; Hedge ve Roa, 2009).

Hamarmatoz polipozis sendromlarından juvenile polipozis sendromunun kabaca %25'inde BMPR1A geni, %15'inde SMAD4 geni mutasyonları görülmektedir. Peutz-Jeghers sendromunda STK11 geni mutasyonu %40-60 sıklıkla görülmektedir (Sayed ve ark., 2002; Ballhausen ve Gunther, 2003).

Sporadik kolorektal kanserler için genetik tarama çoğunlukla gaitanın üzerinde kalan barsak epitelinden elde edilen DNA kullanılarak yapılmaktadır. Sporadik kolorektal kanserler için en yaygın kullanılan DNA belirteçleri KRAS, APC, P53 ve BAT26'dır (Villa, 2000; Crawfford ve ark 2003).

Fearon ve Vogelstein tarafından 1990 yılında ortaya atılan kolorektal tümör gelişiminin genetik modeline göre onkogen ve tümör süpressör genlerdeki ardışık mutasyonlar tek bir leyondan (crypt) adenomatöz polipler ve malin kanserlerin oluşumunu sağlamaktadır. Bu teoriye göre kolorektal kanserdeki en erken genetik değişimlerden biri APC (Adenomatöz polipozis koli) tümör süpresör genindeki mutasyondur. İkincil olarak meydana gelen onkogen mutasyonları (özellikle KRAS)

APC homozigot mutant hücreler için bir büyüme avantajı sağlayarak kanser gelişimine katkıda bulunmaktadır.

Fearon ve Vogelstein'in kolorektal kanserde başlatıcı etkiye sahip olarak işaret ettiği APC geni Wnt sinyal iletim yolağının bir elemanıdır. Günümüzde yapılan pek çok araştırma Fearon ve Vogelstein tarafından yapılan bu ilk çalışmayı doğrular nitelikte, Wnt sinyal iletim yolağının kolorektal kanser başlama ve gelişiminde çok önemli bir yere sahip olduğunu göstermiştir. APC'nin kanser gelişimindeki rolü hakkında bilinen pek çok bilgi kalıtsal kolorektal kanser sendromlarından olan familial adenomatoz polipozis (FAP) üzerine yapılmış çalışmalardan edinilmiştir. Bir allelinde kalıtsal APC mutasyonu bulunan bireyler yabani tip alleldeki heterozigotluğun kaybı ile kolonlarında yüzlerce polip geliştirmektedirler (Kinzler ve Vogelstein, 1996). Son 10 yılda yapılan çalışmalar APC mutasyonlarının Wnt sinyal iletim yolağının sürekli olarak aktivasyonuna neden olduğunu ve böylece kansere zemin hazırladığını göstermiştir.

“Wnt sinyal iletim yolağı kolorektal kanserde neden bu kadar önemlidir?” sorusunun cevabı barsak epitelinin biyolojisinde yatmaktadır. Bazı morfolojik farklılıklara rağmen ince ve kalın barsakta epitelin temel dizaynı genel olarak aynıdır. İnce barsak epiteli kriptler (Crypt, çukur) ve villuslar içerir. Kriptlerde bölünerek villus içine göçen ve bu esnada farklılaşarak değişik hücre tiplerini oluşturan bir kök hücre bölgesi bulunmaktadır. Villus apeksini geçen farklılaşmış hücreler ölürler ve barsak lümenine dökülürler. Bu çoğalma ve izleyen farklılaşma döngüsü çok hızlıdır. Fare ince barsağındaki kök hücrelerin %60'ı 12 saat içinde bu döngüyü tamamlarlar ve epitelium hücrelerini oluşturacak enterositler 2-3 gün içinde villusun tabanından tepesine göçerler. Farelerde kök hücre aktivitesinin olduğu bu bölgelerde Tcf4'ün (TCF ailesi üyesi, spesifik olarak meme bezleri ve barsak hücrelerinde eksprese edilir) ekspresyonu artmaktadır. Bu gözlemler, çevreleyen mezenseyal hücreler tarafından aktive edilen Wnt sinyal iletim yolağının yetişkin barsak epitelinde Tcf4'ün aktive olabileceğini ortaya koymaktadır (Bienz ve Clevers, 2000; Giles ve ark., 2003).

Wnt sinyal iletim yolağının inhibitörlerinden olan SFRP2 geni yapılan pek çok çalışmada kolorektal kanser için önemli bir gen olarak işaret edilmiştir. Wang ve Tang (2008) kolorektal kanser dokularının %91.3'ünde ve kolorektal kanserli hastalara ait fekal örneklerin %61.8'inde SFRP2 hipermetilasyonu saptamışlardır. Yazarlar bu sonuçlar ışığında SFRP2 geninin fekal DNA'da kanser markırı olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Suzuki ve ark. (2004) SFRP proteinlerinin Wnt

sinyal iletim yolağının diğer elemanlarında mutasyon olması durumunda bile sinyal iletimini durdurabildiğini ve özellikle SFRP2 hipermetilasyonunun ardından Wnt sinyal iletim yolağının APC veya CTNNB1 gibi elemanlarında da tamamlayıcı mutasyonlar olması gerektiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda SFRP hipermetilasyonunun kolorektal kanserin erken evrelerinde başladığını saptamışlardır. Huang ve ark. (2007) kolorektal kanserde SFRP 2 hipermetilasyonunu %94.2 olarak bildirmişler ve yine kolorektal kanser ve kanser öncesi lezyonların saptanabilmesinde fekal testlerde kullanılabilir bir genetik belirteç olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bu tez kapsamında kolorektal kanserde SFRP2 geni promotör hipermetilasyon frekansı % 66.7 (%64.5 tamamen metile %2.2 kısmi metile) olarak saptandı. Araştırılan beş tümör süpressör gen içinde en yüksek hipermetilasyon oranı SFRP2 genine aitti. Bu oran hem Wnt yolağının kolorektal kanserdeki önemini hem de SFRP2 geninin kolorektal kanser taramaları için kullanılabilir bir genetik belirteç olduğu fikrini desteklemektedir. Ayrıca SFRP2 geninin kolorektal kanserde saptanan önemli rolü monoklonal antikolar kullanılarak Wnt sinyal iletimin baskılanması veya SFRP2 geni hipermetilasyonunun ortadan kaldırılması ile kolorektal kanser tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilebilmesine olanak sağlamaktadır.

Kolorektal kanserde en sık olarak araştırılan bir diğer gen KRAS genidir. KRAS geni hem kolorektal kanser taramalarında hem de tedavi şeklinin belirlenmesinde önemli yeri olan bir onkogendir. Onkogenik KRAS mutasyonlarının % 90'ı kodon 12 ve 13'de meydana gelmektedir. Pek çok araştırmacı bu iki kodonun mutasyonlar için duyarlı bölgeler (hot-spot) olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu hipotezi destekleyen pek çok çalışma sigara kullanımının etiyolojik bir faktör olarak yerinin kesin olduğu ve KRAS mutasyonlarının sık gözlemlendiği küçük hücreli olmayan akciğer kanseri üzerine yapılan çalışmalardan gelmektedir. KRAS mutasyonları %20-30 sıklıkla gözlenmektedir ve özellikle sigara kullanımı ile ilişkilendirilen küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) gözlenmektedir. Bu durum KRAS mutasyonlarının sigara bileşenlerindeki karsinojenlere maruziyet ile ilişkili olabileceği hipotezini doğurmaktadır (Arslan ve ark., 2010).

Feng ve ark. (2002) KRAS geninin 1 ve 2. ekzonunda bir sigara bileşeni olan benzo [a] piren diol epoksit (BPDE) ve diğer karsinojenlerin DNA'ya verdiği hasarı ve bu bölgelerdeki DNA tamirinin etkinliğini UVrABC nükleaz kesimi ve bunu takiben ligasyon aracılıklı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemini kullanarak araştırmışlardır. Araştırmanın sonucu olarak özellikle kodon 12'deki ilk guanin bazının çeşitli kimyasal

karsinojenlerle etkileşime girmesini kolaylaştıran bir konformasyonda bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Aynı çalışmada kodon 14'de sitozin bazının da BPDE kaynaklı DNA hasarına açık olduğu belirlenmiştir. Fakat kodon 14 mutasyonları KRAS proteininin konformasyonunu bozmamakta ve normal fonksiyonunu etkilememektedir. Bu nedenle kanserlerde sık olarak rastlanmaz. Ayrıca kodon 14 mutasyonları kodon 12'de oluşanlardan daha etkin bir biçimde tamir edilmektedir. Araştırmacılar kodon 12'nin karsinojenlere yüksek afinitesi ve DNA tamir mekanizmasının bu noktadaki yetersizliği ile KRAS kodon 12 mutasyonlarının daha sık gözleendiğini ileri sürmüşlerdir. Feng ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmanın bir diğer önemli bulgusu ise sigara kaynaklı kodon 12 baz değişimlerinin çoğunlukla kodon G:T transversiyon mutasyonları olmasıdır.

Goodrow ve ark. (1990) tarafından yapılan bir çalışmada şehir havası ve sigara dumanında bulunan bir karsinojen olan 1,3-Bütadienin farelerde kodon 13 G:C transversiyonuna neden olduğunu saptamışlardır.

Kalın barsak akciğerlerden daha farklı karsinojenlere maruz kalmaktadır. Kalın barsak başlıca protein metabolizmasından kaynaklanan nitrojen bileşikleri ve nitrozlayıcı ajanlarca zengindir. Bu bileşikler bakteriler tarafından nitrit ve nitrat redüktazlarca N-nitrozo bileşiklere çevrilirler. N-nitrozo bileşiklerden olan nitrozaminler, nitrozamidler ve nitrozo guaninler özellikle G:A transisyon mutasyonlarına neden olan alkilleyici ajanlardır.

Hughes ve ark., (2001) fazla kırmızı et tüketiminin fekal N-nitrozo bileşiklerini anlamlı derecede arttırdığını saptamışlardır. Kampman ve ark., (1999) ise yüksek et tüketiminin KRAS kodon 12 mutasyonlarını kodon 13 mutasyonlarına göre daha fazla arttırdığını saptamışlardır. Belinsky ve ark., (1998) nitrozaminler ile muamele edilmiş farelerde KRAS aktivasyonu ve promutajenik DNA hasarı oluşumunu araştırmışlardır. Kullanılan nitrozaminler (NNK: 4-(N-metil-N-nitrozamino)-1-(3-piridil)-1-bütan ve NDMA: Nitrozodimetilamin) α -hidroksilasyon yolu ile metilleyici ajanlara aktive edilmiştir. Sonuç olarak kodon 12'de sık (20 fareden 15'i) ve kodon 61'de daha nadir (20 fareden 5'i) olarak mutasyon saptanmıştır. Dahası kodon 12 mutasyonlarının biri hariç tamamı metilleyici ajanların varlığında O⁶-metil guanin oluşumu ile uyumlu olarak G:A transisyonları şeklinde saptanmıştır. KRAS mutasyonları ile ilgili yapılan bu araştırmalar farklı organlarda farklı sebeplerin aynı gende farklı mutasyon tipleri geliştirebileceğini göstermektedir.

Bu tez kapsamında kodon 12'de kodon 13'e oranla daha yüksek mutasyon frekansı saptanmıştır (Çizelge 4.5). Bu sonuç kolon kanseri ve KRAS ile ilgili yapılmış çalışmalar ile uyum göstermektedir. Ayrıca en sık gözlenen mutasyon tipi kolorektal kanserde yapılan diğer çalışmalar ile uyumlu olarak G:A (%69.23) (Tablo 6) transisyonu olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar kırmızı et tüketimi ve bununla ilişkili N-nitrozo bileşiklerin kolorektal kanserdeki yerini doğrulamaktadır.

Kolonda metilleyici ajanlar ile ortaya çıkan G:A transisyon mutasyonlarının artışı, O6-metil-guaninin metil grubunu uzaklaştırarak G:A transisyonlarını önleyen MGMT geninin kolorektal kanser için önemli bir rol üstlendiğini ortaya koymaktadır. Bu tez kapsamında kolorektal kanser dokularında MGMT geninin hipermetilasyon frekansı % 40.9 (tamamen metile % 36.6, kısmi metile % 4.3) olarak saptanmıştır. Shen ve ark (2005) kolorektal kanserde MGMT hipermetilasyon frekansını % 46, Nagasaka ve ark (2008) % 36.1 ve Vogel ve ark (2009) ise % 41 olarak saptamışlardır. Tez kapsamında çıkan sonuçlar daha önce bildirilenler ile uyumlu bulunmuştur.

MGMT hipermetilasyonu ve kolorektal kanser ilişkisi üzerine daha önce yapılan araştırmaların sonuçları MGMT hipermetilasyonunun kolorektal kanserin erken evrelerinde meydana geldiğini ileri sürmektedir (Hawkins ve ark, 2009; Nagasaka ve ark, 2008; de Vogel ve ark 2009). Bu araştırmaların bir diğer sonucu da MGMT inaktivasyonunun G:A transisyonu ile olan pozitif korelasyonudur. Bu tez kapsamında MGMT metilasyonu ve KRAS genindeki G:A transisyon mutasyonları arasında bir ilişki saptanmamıştır (Çizelge 4.7).

MGMT genini önemli bir genetik belirteç yapan bir özelliği kanser tedavisindeki yeridir. MGMT ilk olarak gliomalarda alkilleyici ajanlar ile yapılan kemoterapilerde ön plana çıkmıştır. MGMT ve glioma tedavisine yanıt ile ilgili yapılan pek çok çalışma hipermetile MGMT genine sahip hastaların alkilleyici ajanlar kullanılarak yapılan kemoterapilere daha iyi yanıt verdiğini göstermiştir (Silber ve ark, 1999; Hegi ve ark, 2005; Weller ve ark, 2009). MGMT inaktivasyonu ve kolorektal kanserde alkilleyici ajanlarla yapılan kemoterapilere verilen yanıt üzerine yapılan çalışmalar az olsa da Park ve ark (2010) MGMT -535 G>T polimorfizminin oxaliplatin temelli kemoterapilerde tedaviye yanıtı arttırdığını saptamışlardır.

Bu bilgiler ışığında MGMT inaktivasyonunun kolorektal kanser başlaması için olumsuz bir durum olduğu fakat özellikle alkilleyici ajanlarla yapılan kemoterapilerde tedaviye yanıtı arttıran bir gösterge olduğu söylenebilir. Jacinto ve Esteller (2007) bu

özelliği nedeni ile MGMT genini prognostik düşman ve tahmine yönelik dost (Prognostic foe and predictive friend) olarak tanımlamaktadırlar.

KRAS mutasyonlarının kolorektal kanser prognozu ile ilişkisini araştıran pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları KRAS mutasyonları ve kolorektal kanseri prognozu arasında ilişki olduğunu ileri sürerken bazı çalışmalar sonucunda ilişki saptanmamıştır. Kressner ve ark. (1998), Ogino ve ark. (2009), Wu ve ark. (2005) KRAS mutasyonları ve kolorektal kanser prognozu arasında ilişki saptamamışlardır. Moerkerk ve ark. (1994) G:T ve G:C mutasyonlarının kolorektal kanserlerde metastatik davranış ile ilişkili bulmuşlardır. Ayrıca kodon 12'de saptanan mutasyon sayısının tümör evresindeki artışla beraber arttığını saptamışlardır. Bazan ve ark. (2002) kodon 12 mutasyonlarını müsinöz farklılaşma ile ilişkili bulmuşlar ve kodon 13 mutasyonlarının sağ kalım süresini azalttığını saptamışlardır. Samowitz ve ark. (2000) yine kodon 13 mutasyonlarının sağ kalım süresini azalttığını saptamışlardır. Andreyev ve ark. (2001), Al Mulla ve ark. (1998), Lin ve ark. (2006) kodon 12Val mutasyonlarını kötü prognoz ve sağkalım süresinin kısalması ile ilişkili bulmuşlardır. Nash ve ark. (2010) KRAS mutasyonlarının daha hızlı ve agresif metastatik davranışa neden olduğunu saptamışlardır.

KRAS mutasyonları ilerlemiş kolorektal kanserli hastalarda anti-EGFR antikor tedavilerine direncin belirteci olarak kullanılmaktadır (Dahabreh ve ark., 2011). Anti EGFR ilaçlar olan cetuximab ve panitumumab metastatik kolorektal kanser hastalarının %10-20'sinde etkinlik göstermektedirler. Yapılan pek çok çalışma KRAS mutasyonlarının cetuximab ve panitumumab tedavilerinin %30-40'ında tedaviye yanıtın oluşmamasına neden olduğunu göstermiştir (Lievre ve ark. 2006; Siena ve ark. 2009; Tol ve Punt, 2010; Yen ve ark., 2010). Amerika klinik onkoloji birliği metastatik kolorektal kanserli tüm hastaların anti-EGFR antikor tedavisi almadan önce KRAS mutasyonları açısından test edilmesini, eğer mutasyon saptandıysa hastalara anti EGFR tedavisinin verilmemesini önermektedir (Allegra ve ark., 2009). Hastaların Anti-EGFR tedavisinden önce KRAS mutasyonları açısından taranması hem pahalı olan bu tedavilerin gereksiz yere yapılmasını önleyecek hen de hastaların faydasız bir tedaviden kaynaklanan toksik etkilere maruz kalmasını engelleyecektir (Morton ve Hammond, 2009; Mancl ve ark., 2009).

KRAS mutasyon testinin hem hasta temelli tedavi yaklaşımına hem de gereksiz tedavilerin getirdiği zaman ve para kaybını önlemesi, araştırmacıları hem prognostik hem de tedaviye yanıtı belirleyen yeni genetik belirteçler keşfetmeye itmiştir (Cercek ve

Saltz, 2011; Dientsman ve ark., 2011). BRAF ve PTEN genleri bu amaçla araştırılan genler arasındadır. Di Nicolantonio ve ark. (2008) BRAF mutasyonlarının da panitumumab ve cetuximab tedavilerine yanıtı olumsuz etkilediğini göstermişlerdir.

BRAF mutasyonları sıklıkla melanomalarda (%50) ve papiller tiroid kanserlerde (%30-70) gözlenmektedir. Tüm solid tümörlerde gözlenme sıklığı %8'dir (Dienstmann ve Tabernero, 2011). Kolorektal kanserdeki mutasyon frekansı çeşitli yayınlarda değişiklik göstermekle birlikte %20'yi geçmemektedir. BRAF geninin kolorektal kanserdeki mutasyon frekansı Li ve ark. (2011) tarafından %7, Chang ve ark. (2006) tarafından %4.2, Berg ve ark. (2010) tarafından %16 olarak saptanmıştır. Bu tez kapsamında BRAF mutasyon frekansı % 12.9 olarak saptanmıştır. Bu değer literatürde daha önce bildirilen oranlar arasındadır.

Kolorektal kanserde BRAF mutasyon frekansının düşük olması bu onkogenin kolorektal kanser taramaları için uygun olmamasına neden olmaktadır. Fakat BRAF mutasyonları kolorektal kanserde tartışmasız bir prognostik öneme sahiptir. Van Cutsem ve ark. (2011) BRAF mutasyonlarını kolorektal kanserli hastalarda kötü prognoz indikatörü olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yokota ve ark., (2011) BRAF mutasyonlarını ilerlemiş ve tekrarlayan kolorektal kanser için en güçlü prognostik faktör olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p16 (CDKN2A) hücre döngüsündeki önemli fonksiyonu nedeni ile pek çok kanser türünde sıklıkla çalışılmış bir tümör süpresör genidir. p16 geninin bu önemli görevine karşın çeşitli organ kanserlerinden elde edilen hipermetilasyon sonuçları çelişki göstermektedir. Trzeciak ve ark. (2001) p16 hipermetilasyonunu kanser örneklerinde % 53, buna karşın normal dokularda % 73 olarak saptamışlardır. Benzer şekilde Gonzales-Zulueta ve ark. (1995) p16 hipermetilasyonunu kolorektal kanserde % 10 ve normal kolon mukoza örneklerinde %60 olarak saptamışlardır. Bu araştırmalarda çalışma populasyonunun küçük olması (ilk çalışma için 55 ve ikinci çalışma için 12 hasta ve kontrol kullanılmış) şansa bağlı olasılıkları akla getirmektedir. Ahuja ve ark., (1997) p16 metilasyonunu MI+ kolorektal kanserlerde (Mikrosatellit instabilitesinin bulunduğu kanserler) % 60 olarak saptarken MI- kanserlerde % 22 olarak saptamışlardır. Guan ve ark (1999) p16 hipermetilasyonunu kolorektal kanser dokularında %55 olarak saptamışlardır. Aynı çalışmada KRAS mutasyonları bulunan örneklerin %38'inde p16 hipermetilasyonu saptanmıştır. Shannon ve Iacopetta (2001) kolorektal kanserde p16 hipermetilasyonunu %29, Lee ve ark. (2006) ise %32.3 olarak saptamışlar ve p16 metilasyonu ile

mikrosatellit instabilitesi arasında bir ilişki saptamamış fakat p16 hipermetilasyonu ile lenf nodu metastazı arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır.

Bu tez kapsamında p16 geni promotör hipermetilasyonu frekansı %15.1 (%14 tamamen metile, % 1.1 kısmi metile) olarak saptandı. Bu oranın literatürde p16 için daha önce saptanan oranlardan daha düşüktür. Çalışmalar arasında çıkan bu farklılıklar bazen metile DNA'nın saptanmasında kullanılan yöntemin farklılığından kaynaklanmaktadır. Örneğin kolay, ucuz ve kullanışlı bir yöntem olan bisülfid muamelesini izleyen metil spesifik PCR'm (MSP) DNA'da çok miktarda kırılmaya neden olduğu bilinmektedir (Grunau ve ark., 2001). MSP'm alternatifi olan, metile CpG'lere yönelik kullanılan immün çöktürme yöntemi, metile DNA'ların saptanma olasılığını arttırmakta fakat düşük yoğunlukta CpG adalarından kaynaklanan bir kirliliği de yanında getirmektedir. Sakamoto ve ark., (2010) p16 promotör hipermetilasyonunu hem MSP hem de IM-MSP (İmmün çöktürme- metil spesifik PCR) yöntemlerini kullanarak araştırmışlar ve IP-MSP nin metile p16 promotörünü saptamadaki duyarlılığını MSP yönteminden anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (IP-MSP için %81 ve MSP için %59).

Apoptozu indükleyen bir serin treonin kinaz olan DAPK1 başlıca akciğer kanserinde sıklıkla çalışılmıştır. Yamaguchi ve ark. (2003) 122 kolorektal kanser örneğinin % 55'inde DAPK1 hipermetilasyonu saptamışlar ve DAPK1 hipermetilasyonu ile tümör farklılaşması, metastaz ve tümör lokalizasyonu arasında bir ilişki saptamamışlardır. Mittag ve ark. (2006) parafin kesitlerde yaptıkları çalışmada DAPK1 hipermetilasyonunu kanser alanlarında %81.2, intraepitelyal neoplazilerde %68.2 ve kansere komşu normal dokularda ise %25 oranında saptamış ve oranlar arasındaki bu farkı göz önünde bulundurarak DAPK1 hipermetilasyonunu kolorektal kanserin erken evreleri için önemli bir rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. Schneide-Stock ve ark. (2004) DAPK1 mutasyonunu taze-dondurulmuş doku örneklerinde %58 olarak saptamışlardır. DAPK1 metilasyonuna sahip hastaların çoğunda azalmış apoptoz ve Bcl2 geninin aşırı ekspresyonu gözlenmiştir. DAPK1 hipermetilasyonu ile tümör lokalizasyonu ve sınıflandırılması arasında bir ilişki saptanmamıştır. Bu tez kapsamında DAPK1 promotör hipermetilasyonu %45.2 olarak saptandı. DAPK1 geni SFRP 2 geninden sonra en sık hipermetilasyon gösteren gen idi.

Bir dizi spesifik transkripsiyonel represör olan HIC1 geninin epigenetik inaktivasyonu prostat kanseri (Morton ve ark., 1996), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (Eguchi ve ark., 1997; Hayashi ve ark., 2001), meme kanseri (Fuji ve ark.,

1998), karaciğer kanseri (Kanai ve ark 1998) ve özefagus kanserleri (Huang ve ark., 2000) gibi pek çok kanser türünde bildirilmesine rağmen kolorektal kanserlerde sık olarak çalışılmamıştır. Wahab ve ark. (2011) HIC 1 geninin kolorektal kanserdeki hipermetilasyon frekansını %41.7 olarak saptamışlar ve HIC1 hipermetilasyonu ve klinopatolojik özellikler arasında bir ilişki saptamamışlardır. Bu tez kapsamında HIC1 geninin hipermetilasyonu Wahab ve ark. (2011) tarafından bildirilen frekansa çok yakın olarak (%40.9) saptanmıştır.

DNA hipermetilasyonu tümörigenezde erken bir olaydır ve tümör oluşumunun başlaması, ilerlemesi ve çok sayıda genetik ve epigenetik değişimin birikmesi için verimli bir zemin oluşturmaktadır. Kolorektal kanserde bu durum “bölge hasarı” (field defect) olarak tabir edilen durumun yani tümöre komşu normal dokuların çeşitli epigenetik değişimler ve mutasyonlar taşıması tarafından desteklenmektedir (Ushijima, 2005).

Kolorektal kanserde kanser dokusu ve normal kolon mukozasında yapılan çalışmaların çoğunda normal kolon dokusunda DNA hipermetilasyonu bildirilmektedir. Minoo ve ark. (2006) kanser öncesi bir durum olan hiperplastik polipoziste normal kolon mukozasında yoğun bir şekilde tümör süpresör gen hipermetilasyonu (MGMT, p16, DAPK1, MLH1, RASSF1, RASSF2 genlerinde) göstermişlerdir. Yazarlar hiperplastik polipozisin bazı formlarında genetik yatkınlığın olabileceğini ve bunun da en erken göstergesinin normal kolon mukozasındaki çoklu tümör süpresör gen hipermetilasyonu olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ahuja ve ark. (1998) normal kolon mukozasında ileri yaşa bağlı tümör süpresör gen hipermetilasyonu saptamışlardır. Kawakami ve ark. (2006) kolorektal kanserli hastaların normal kolon mukozasında altı genin (ER α , MYOD, p16, MLH1, APC, DAPK, TIMP3) metilasyonunu araştırmışlar ve ER α , MYOD genlerinin hipermetilasyonunun ileri yaş kadın hastalarda arttığını saptamışlardır.

Kolorektal kanserde normal dokuda hipermetilasyon gözlenmesi tümör süpresör genlerin Tip A ve Tip C olarak iki sınıfa ayrılmasına neden olmuştur. Tip A genler artan yaşa bağlı olarak hipermetile olan genlerdir ve ER α ve MYOD örnek verilebilir. Tip C genler kanser spesifik hipermetilasyon gösteren genlerdir ve p 16, MLH1, TIMP1 örnek gösterilebilir. Bu tez kapsamında araştırılan 14 hastada en düşük hipermetilasyon p16 genine (1 kısmi metilasyon) aitti. Bununla birlikte DAPK1 (%28.57 tamamen metile, %7.4 kısmi metile), SFRP2 (%50 tamamen metile, %14.28 kısmi metile), HIC1 (%35.71 tamamen hipermetile) ve MGMT (%50 tamamen metile, %14.28 kısmi metile)

genlerinde hipermetilasyon saptanmıştır. Kullanılan normal kolon doku sayısı az olmasına rağmen sonuçlar bilgi verici görülmektedir. Normal kolorektal mukozada gözlenen ve yaşa bağlı tümör süpresör hipermetilasyonu ileri yaşın kolorektal kanser için neden bir risk faktörü olarak değerlendirildiğini açıklamaktadır (Issa, 1999).

DNA metilasyon belirteçleri çeşitli avantajlara sahiptir. Birincisi metilasyon analizleri DNA üzerinden yapılır. DNA ise RNA ve proteinlere göre daha karardır. Bu durum DNA metilasyonunu en karardlı belirteç yapmaktadır. Diğer yandan DNA metilasyonu bazı kanserler için vücut sıvılarından ve kolorektal kanser için gaitadan saptanabilmektedir. Bu durum non-invazif tarama yöntemlerinin uygulanabilirliğini sağlamaktadır. Aynı zamanda DNA metilasyonu geri dönüşümlüdür ve bu durum da metilasyonu tedaviye yönelik bir hedef olarak cazip kılmaktadır.

Kanserde DNA metilasyon paterni tümörler arası ve bireyler arası farklılıklardan sorumludur. Bireyler arası farklılık en iyi şekilde CpG metilatör fenotip ya da CIMP (CpG island methylator phenotype) olarak bilinen ve hasta DNA'larındaki CpG adaların yaygın olarak metile durumda bulunduğu durumda gözlenmektedir. CIMP pozitif hastalar en iyi kolorektal kanserde tanımlanmıştır. Bu hastalar kolorektal kanserli hastaların %20-40'ını oluşturmaktadır. CIMP genellikle mikrosatellit kararsızlığı (MSI, microsatellite instability), tümörün genellikle çıkan kolonda olması, ileri hasta yaşı ve kadın hastaların daha sık olması ile birlikte gözlenmektedir (Shen ve ark., 2007).

Mikrosatellit kararsızlığı DNA'daki kısa tekrarlı dizilerin sayısının azalması veya artmasıdır. Bu kararsızlık DNA replikasyonu esnasındaki kaymadan meydana gelmektedir ve hatalı eşleşme tamir mekanizması tarafından tamir edilmektedir. Tümörlerde hatalı eşleşme tamir sisteminin bozuk olması bu hataların birikmesi ve mikrosatellit kararsızlığı ile sonuçlanır. Mikrosatellit kararsızlığı kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser (HNPCC)'de görülmektedir. Mikrosatellit kararsızlığı aynı zamanda sporadik kolorektal kanserli hastaların %10-15'inde gözlenmektedir (Samowitz, 2008).

Yapılan çalışmalar CIMP ve MSI ile KRAS ve BRAF mutasyonlarının ilişkili olduğunu göstermektedir. Ahlquist ve ark. (2008) BRAF mutasyonları ile CIMP ve MSI'nin birlikteliğini kolorektal kanserde anlamlı sıklıkta saptamışlardır. Noshu ve ark. (2008) beş tümör süpresör genin hipermetilasyonunun (CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3 and SOCS1 genleri) BRAF mutasyonlu bireylerde daha sık görüldüğünü saptamışlar ve KRAS mutasyonları ve tümör süpresör promotör hipermetilasyonları arasında ilişki saptamamışlardır. Lee ve ark. (2008) CIMP+ kolorektal kanserlerin BRAF mutasyonları ile pozitif ilişkili olduğunu ve CIMP+/MSI-'li hastaların kötü

linik seyire sahip olduklarını saptamışlardır. Tanaka ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmanın bulguları yine CIMP ve BRAF mutasyonlarının birlikteliğini destekler niteliktedir. Bu tez kapsamında da araştırılan tümör süpresör genlerin promotör hipermetilasyonları ve onkogen mutasyonlarının birlikte gözlenme sıklıkları araştırılmış ve hipermetile tümör süpresör genler ile KRAS mutasyonları arasında anlamlı bir birliktelik saptanmazken BRAF mutasyonları ile SFRP2 ve p16 genleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik saptanmıştır. Bu sonuç literatürde daha önce yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçları desteklemektedir.

Sonuç olarak; çalışma grubunda KRAS mutasyonları sık bir şekilde (%54.84) gözlenmiştir. Saptanan KRAS mutasyon sıklığı literatürde daha önce bildirilenlerle uyumlu oluydu ve yine literatür ile uyumlu olarak en sık mutasyon frekansı kodon 12'de saptandı. BRAF mutasyon sıklığı % 12.9 olarak saptandı. Çalışma grubunda araştırılan tümör süpresör genler içinde en sık hipermetile olan gen SFRP2 (%66.7) idi. SFRP2 geni sırası ile DAPK1 (%45.2), MGMT (%40.9), HIC1 (%40,9) ve p16 (%15.1) genleri tarafından izlendi. Tümör süpresör gen promotör hipermetilasyonları ve KRAS mutasyonları arasında anlamlı bir birliktelik saptanmazken, BRAF mutasyonlarının hipermetile SFRP2 ve p16 genleri ile birliktelikleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu (SFRP2 için $P=0.005$ ve p16 için $P=0.016$). Normal kolon mukozası ile yapılan analizler hipermetilasyon ve mutasyonların sadece tümör dokularında değil aynı zamanda hastalara ait normal kolon dokusunda da gözlenebileceğini gösterdi.

Yapılan araştırmanın sonuçları daha önce bildirilen araştırma sonuçları ile birleştirildiğinde KRAS mutasyonları ve SFRP2 hipermetilasyonunun kolorektal kanser taramaları için kullanılabilir genetik belirteçler olduğu, kanserli bireylerde onkogen aktivasyonları ve tümör süpresör gen hipermetilasyonlarının saptanmasının hem hastalık seyri ile ilgili bilgi verici hem de tedaviyi yönlendirici olduğu saptanmıştır.

6. KAYNAKLAR

Adjei, A.A. (2001). Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy, *J Natl Cancer Inst*, Vol. 93(14), 1062-1074.

Adjei, A.A. (2001). Ras signaling pathway proteins as therapeutic targets, *Curr Pharm Des*, Vol. 7(16), 1581-94.

Ahlquist, T., Lind, G.E., Costa, V.L., Meling, G.I., Vatn, M., Hoff, G.S., Rognum, T.O., Skotheim, R.I., Thiis-Evensen, E., Lothe, R.A. (2008). Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers, *Mol Cancer*, Vol. 7, 94.

Ahuja, N., Li, Q., Mohan, A.L., Baylin, S.B., Issa, J.J. (1998). Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer, *Cancer Research*, Vol. 58, 5489-5494.

Ahuja, N., Mohan, A.L., Li, Q., Stolker, J.M., Herman, J.G., Hamilton, S.R., Baylin, S.B., Issa, J.P. (1997). Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer, *Cancer Res*, Vol. 57, 3370–3374.

Allegra, C.J., Jessup, J.M., Somerfield, M.R., Hamilton, S.R., Hammond, E.H., Hayes, D.F., McAllister, P.K., Morton, R.F., Schilsky, R.L. (2009). American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy, *J Clin Oncol*, Vol. 27(12), 2091-2096.

Al-Mulla, F., Going, J.J., Sowden, E.T., Winter, A., Pickford, I.R., Birnie, G.D. (1998). Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality, *J Pathol*, Vol. 185(2), 130-138.

Andreyev, H.J., Norman, A.R., Cunningham, D., Oates, J., Dix, B.R., Iacopetta, B.J., Young, J., Walsh, T., Ward, R., Hawkins, N., Beranek, M., Jandik, P., Benamouzig, R., Jullian, E., Laurent-Puig, P., Olschwang, S., Muller, O., Hoffmann, I., Rabes, H.M.,

Zietz, C., Troungos, C., Valavanis, C., Yuen, S.T., Ho, J.W., Croke, C.T., O'Donoghue, D.P., Giaretti, W., Rapallo, A., Russo, A., Bazan, V., Tanaka, M., Omura, K., Azuma, T., Ohkusa, T., Fujimori, T., Ono, Y., Pauly, M., Faber, C., Glaesener, R., de Goeij, A.F., Arends, J.W., Andersen, S.N., Lövig, T., Breivik, J., Gaudernack, G., Clausen, O.P., De Angelis, P.D., Meling, G.I., Rognum, T.O., Smith, R., Goh, H.S., Font, A., Rosell, R., Sun, X.F., Zhang, H., Benhattar, J., Losi, L., Lee, J.Q., Wang, S.T., Clarke, P.A., Bell, S., Quirke, P., Bubb, V.J., Piris, J., Cruickshank, N.R., Morton, D., Fox, J.C., Al-Mulla, F., Lees, N., Hall, C.N., Snary, D., Wilkinson, K., Dillon, D., Costa, J., Pricolo, V.E., Finkelstein, S.D., Thebo, J.S., Senagore, A.J., Halter, S.A., Wadler, S., Malik, S., Krtolica, K., Urosevic, N. (2001). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study, *Br J Cancer*, Vol. 85(5), 692-696.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2010*. Atlanta: American Cancer Society; 2010.

Andreyev, H.J., Ross, P.J., Cunningham, D., Clarke, P.A. (2001) Antisense treatment directed against mutated Ki-ras in human colorectal adenocarcinoma, *Gut*, Vol. 48(2), 230-237.

Arslan, S., Akkurt, I., Koksall, B., Karadayi, S., Ozdemir, O. (2010). Predictive significance of KRAS point mutation in patients with non-small cell lung carcinoma relation to smoking and asbestos exposure in middle Anatolia population, *Healthmed*, Vol. 4(4), 715-719.

Ballhausen, W.G., Gunther, K. (2003). Genetic screening for Peutz-Jeghers syndrome, *Expert Rev Mol Diagn*, Vol. 3, 471-479.

Bahçeci, Z. (1997) *Moleküler biyoloji*, Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Yayınları. 3. Baskı. Ankara, 180-190p.

Bazan, V., Migliavacca, M., Zanna, I., Tubiolo, C., Grassi, N., Latteri, M.A., La Farina, M., Albanese, I., Dardanoni, G., Salerno, S., Tomasino, R.M., Labianca, R., Gebbia, N., Russo, A. (2002). Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome

in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype, *Ann Oncol*, Vol.13(9), 1438-1446.

Beeram, M., Patnaik, A., Rowinsky, E.K. (2005). Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer, *J Clin Oncol*, Vol. 23(27), 6771-90.

Robinson, M.J., Cobb, M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways, *Curr Opin Cell Biol*, Vol. 9, 180–186.

Belinsky, S.A., Devereux, T.R., Maronpot, R.R., Stoner, G.D., Anderson, M.W. (1998). Relationship between the formation of promutagenic adducts and the activation of the K-ras protooncogene in lung tumors from A/J mice treated with nitrosamines, *Cancer Res*, Vol. 49(19), 5305-5311.

Berg, M., Danielsen, S.A., Ahlquist, T., Merok, M.A., Ågesen, T.H., Vatn, M.H., Mala, T., Sjø, O.H., Bakka, A., Moberg, I., Fetveit, T., Mathisen, Ø., Husby, A., Sandvik, O., Nesbakken, A., Thiis-Evensen, E., Lothe, R.A. (2010). DNA sequence profiles of the colorectal cancer critical gene set KRAS-BRAF-PIK3CA-PTEN-TP53 related to age at disease onset, *PLoS One*, Vol. 5(11), e13978.

Bhakat, K.K., Mitra, S. (2000). Regulation of the Human *O6*-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene by Transcriptional Coactivators cAMP Response Element-binding Protein-binding Protein and p300, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275(44), 34197-34204.

Bialik, S., Bresnick, A.R., Kimchi, A. (2004). DAP-kinasemediated morphological changes are localization dependent and involve myosin-II phosphorylation, *Cell Death Differ*, Vol. 11, 631–644.

Bialik, S., Kimchi, A. (2006). The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond, *Annu Rev Biochem*, Vol. 75, 189–210.

Bienz, M., Clevers, H. (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling, *Cell*, Vol. 103(2), 311-320.

Boyd, V.L., Zon, G. (2004). Bisulfite conversion of genomic DNA for methylation analysis: protocol simplification with higher recovery applicable to limited samples and increased throughput, *Analytical Biochemistry*, Vol. 326, 278–280.

Brink, M., de Goeij, A.F., Weijenberg, M.P., Roemen, G.M., Lentjes, M.H., Pachen, M.M., Smits, K.M., de Bruïne, A.P., Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A. (2003). K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study, *Carcinogenesis*, Vol. 24(4), 703-710.

Büyükdoğan, M. (2009). Kolorektal kanserde genetik ve etiyolojik faktörler, *Selçuk Tıp Derg*, Vol. 25 (3), 171-180.

Carter, M.G., Johns, M.A., Zeng, X., Zhou, L., Zink, M.C., Mankowski, J.L., Donovan, D.M., and Baylin, S.B. (2000). Mice deficient in the candidate tumor suppressor gene *Hic1* exhibit developmental defects of structures affected in the Miller-Dieker syndrome, *Hum Mol Genet*, Vol. 9, 413–419.

Cercek, A., Saltz, L. (2011). BEYOND KRAS: Other Markers and Potential Treatment Strategies for KRAS Mutant and Wild-type Patients, *Curr Treat Options Oncol*, 2011 Vol.12(2),126-135.

Chang, S.C., Lin, J.K., Yang, S.H., Wang, H.S., Li, A.F., Chi, C.W. (2006). Relationship between genetic alterations and prognosis in sporadic colorectal cancer, *Int J Cancer*, Vol. 118(7), 1721-1727.

Chen, R., Wang, W. and Kuo, J. (2006). The tumor suppressor DAP-kinase links cell adhesion and cytoskeleton reorganization to cell death regulation, *Journal of Biomedical Science*, Vol. 13, 193- 199.

Chin, L., Pomerantz, J., DePinho, R.A. (1998). The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene--two products--two pathways, *Trends Biochem Sci*, Vol. 23(8), 291-296.

Clark, S.J., Statham, A., Stirzaker, C., Molloy, P.L., Frommer, M. (2006). DNA methylation: Bisulphite modification and analysis, *Nature Protocols*. Vol. 1, 2353 – 2364.

Clark, S.J., Melki, J. (2002). DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party?, *Oncogene*, Vol. 21, 5380 – 5387.

Cohen, O., Feinstein, E. and Kimchi, A. (1997). DAP kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity, *The EMBO Journal*, Vol. 16, 998- 1008.

Costello, J.F., Plass, C. (2001). Methylation matters, *J Med Genet*, Vol. 38(5), 285-303.

Costello, J.F., Futscher, B.W., Kroes, R.A., and Pieper, R.O. (1994a). Methylation-related chromatin structure is associated with exclusion of transcription factors from and suppressed expression of the O-6-methylguanine DNA methyltransferase gene in human glioma cell lines, *Mol Cell Biol*, Vol. 14, 6515–6521.

Costello, J.F., Futscher, B.W., Tano, K., Graunke, D.M., and Pieper, R.O. (1994b). Graded methylation in the promoter and body of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells, *J Biol Chem*, Vol. 269,17228–17237.

Costello, J. F., Berger, M.S., Huang, H.S., Cavenee, W.K. (1996). Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation, *Cancer Res*, Vol. 56, 2405–2410.

Coudreuse, D., Korswagen, H.C. (2007). The making of Wnt: new insights in to Wnt maturation, sorting and secretion, *Development*, Vol. 134(1), 3-12.

Crawford, N.P., Colliver, D.W., Galandiuk, S. (2003). Tumor markers and colorectal cancer: utility in management, *J Surg Oncol*, Vol. 84(4), 239-248.

Croce, C.M. (2008). Oncogenes and cancer, *N Engl J Med*, Vol. 385, 503- 511.

Çefle, K. (2009). Kanser genetiği, Klinik Gelişim, Vol. 3, 50-59.

Dahabreh, I.J., Terasawa, T., Castaldi, P.J., Trikalinos, T.A. (2011). Systematic review: Anti-epidermal growth factor receptor treatment effect modification by KRAS mutations in advanced colorectal cancer, *Ann Intern Med*, Vol. 154(1), 37-49.

Deng, G., Bell, I., Crawley, S., Gum, J., Terdiman, J.P., Allen, B.A., Truta, B., Sleisenger, M.H., Kim, Y.S. (2004). BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer, *Clin Cancer Res*, Vol. 10 (1 Pt 1), 191–195.

Deltour, S., Pinte, S., Guerardel, C., Wasyluk, B., and Leprince, D. (2002). The human candidate tumor suppressor gene HIC1 recruits CtBP through a degenerate GLDLSKK motif, *Mol Cell Biol*, Vol. 22, 4890–4901.

de Vogel, S., Weijenberg, M.P., Herman, J.G., Wouters, K.A., de Goeij, A.F., van den Brandt, P.A., de Bruïne, A.P., van Engeland, M. (2009). MGMT and MLH1 promoter methylation versus APC, KRAS and BRAF gene mutations in colorectal cancer: indications for distinct pathways and sequence of events, *Ann Oncol*, Vol. 20(7), 1216-1222.

Dienstmann, R., Tabernero, J. (2011). BRAF as a Target for Cancer Therapy, *Anticancer Agents Med Chem*, Vol. 11(3), 285-295.

Diehl, J. A., Zindy, F., and Sherr, C. J. (1997). Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway, *Genes Dev*. Vol. 11, 957–972.

Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., Sartore-Bianchi, A., Arena, S., Saletti, P., De Dosso, S., Mazzucchelli, L., Frattini, M., Siena, S., Bardelli, A. (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer, *J Clin Oncol*, Vol. 26(35), 5705-5712.

Eckhardt, F., Lewin, J., Cortese, R., Rakyan, V.K., Attwood, J., Burger, M., Burton, J., Cox, T.V., Davies, R., Down, T.A., Haefliger, C., Horton, R., Howe, K., Jackson, D.K., Kunde, J., Koenig, C., Liddle, J., Niblett, D., Otto, T., Pettett, R., Seemann, S., Thompson, C., West, T., Rogers, J., Olek, A., Berlin, K., Beck, S. (2006). DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22, *Nat Genet*, Vol. 38(12),1378-1385.

Eguchi, K., Kanai, Y., Kobayashi, K., Hirohashi, S. (1997). DNA hypermethylation at the D17S5 locus in non-small cell lung cancers: its association with smoking history, *Cancer Res* Vol. 57, 4913–4915.

Erarslan, E., Türkyay, C. (2007). Kolorektal kanser etyolojisi ve predispozan faktörler, *Güncel Gastroenteroloji*, Vol. 11/1, 19-26.

Esteller, M. (2005). Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers, *Journal of Pathology*, Vol. 205, 172-180.

Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future, *Oncogene*, Vol. 21, 5427 – 5440.

Esteller, M., Herman, J.G. (2004). Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer, *Oncogene*, Vol. 23, 1–8.

Feng, Z., Hu, W., Chen, J.X., Pao, A., Li, H., Rom, W., Hung, M.C., Tang, M.S. (2002). Preferential DNA damage and poor repair determine ras gene mutational hotspot in human cancer, *J Natl Cancer Inst*, Vol. 94(20), 1527-1536.

Fleuriel, C., Touka, M., Boulay, G., Guérardel, C., Rood, B.R., Leprince, D. (2009). HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors, *Int J Biochem Cell Biol*, Vol. 41(1), 26-33.

Fong, K.W., Sekido, Y., Minna, J.D., 1999, Molecular pathogenesis of lung cancer, *J Thorac Cardiovasc Surg*, Vol. 118, 1136-1152.

Friso, S., Choi, S.W. (2009). *Nutrients and epigenetics*, CRC Press, New York, 1-7p.

Fujii, H., Biel, M.A., Zhou, W., Weitzman, S.A., Baylin, S.B., Gabrielson, E. (1998). Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer, *Oncogene*, Vol. 16, 2159–2164.

Gardner, R.J., Kool, D., Edkins, E., Walpore, I.R., Macrae, F.A., Nasioulas, S., Scott, W.J. (1997). The clinical correlates of a 3' truncating mutation (codons 1982–1983) in the adenomatous polyposis coli gene, *Gastroenterology*, Vol. **113**, 326–331.

Garnett, M.J., Marais, R. (2004). Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene, *Cancer Cell*, Vol. 6(4), 313-319.

Giles, R.H., van Es, J.H., Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer, *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1653(1), 1-24.

Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C.-L., Zhang, X., Golic, K. G., Jacobsen, S. E., and Bestor, T. H. (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2, *Science*, Vol. 311, 395–398.

Gonzalez-Zulueta, M., Bender, C.M., Yang, A.S., Nguyen, T., Beart, R.W., Van Tornout, J.M., Jones, P.A. (1995). Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing, *Cancer Research*, Vol. 55, 4531- 4535.

Gonzalvo, M.L., Jones, P.A. (1997). Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation, *Mutat Res*, Vol. 386(2), 107-118.

Goodrow, T., Reynolds, S., Maronpot, R., Anderson, M. Activation of K-ras by codon 13 mutations in C57BL/6 X C3H F1 mouse tumors induced by exposure to 1,3-butadiene, *Cancer Res*, Vol. 50(15), 4818-4823.

Grunau, C., Clark, S.J., Rosenthal, A. (2001). Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters, *Nucleic Acids Res*, Vol. 129(13), E65–75.

Guan, R.J., Fu, Y., Holt, P.R., Pardee, A.B. (1999). Association of K-ras mutations with p16 methylation in human colon cancer, *Gastroenterology*, Vol. 16, 1063–1071.

Guerardel, C., Deltour, S., Pinte, S., Monte, D., Begue, A., Godwin, A.K., and Leprince, D. (2001). Identification in the human candidate tumor suppressor gene HIC-1 of a new major alternative TATA-less promoter positively regulated by p53, *J Biol Chem*, Vol. 276, 3078–3089.

Harris, L.C., Potter, P.M., Tano, K., Shiota, S., Mitra, S., and Brent, T.P. (1991). Characterization of the promoter region of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene, *Nucleic Acids Res*, Vol. 19, 6163–6167.

Harris, L.C., Remack, J.S., and Brent, T.P. (1994). Identification of a 59 bp enhancer located at the first exon/intron boundary of the human O6-methylguanine DNA methyltransferase gene, *Nucleic Acids Res*, Vol. 22, 4614–4619.

Hawkins, N.J., Lee, J.H., Wong, J.J., Kwok, C.T., Ward, R.L., Hitchins, M.P. (2009). MGMT methylation is associated primarily with the germline C>T SNP (rs16906252) in colorectal cancer and normal colonic mucosa, *Mod Pathol*, Vol. 22(12), 1588-1599.

Hayashi, M., Tokuchi, Y., Hashimoto, T., Hayashi, S., Nishida, K., Ishikawa, Y. (2001). Reduced HIC-1 gene expression in non-small cell lung cancer and its clinical significance, *Anticancer Res*, Vol. 21, 535–540.

Hayashi, M., Tokuchi, Y., Hashimoto, T., Hayashi, S., Nishida, K., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Tsuchiya, S., Okumura, S., Tsuchiya, E.(2001). Reduced HIC-1 gene expression in non-small cell lung cancer and its clinical significance, *Anticancer Res*, Vol. 21, 535– 540.

Hayatsu, H., Shiraishi, M., Negishi, K. (2008). Bisulfite Modification for Analysis of DNA Methylation, *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, Vol. 33, 6-10.

Hegde, M.R., Roa, B.B. (2009). Genetic testing for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC), *Curr Protoc Hum Genet*, Vol. 10, 10-12.

Heinemann, V., Stintzing, S., Kirchner, T., Boeck, S., Jung, A. (2009). Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR, *Cancer Treat Rev*, Vol. 35(3), 262-271.

Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E.C., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C., Stupp, R. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma, *N Engl J Med*, Vol. 352, 997-1003.

Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D., Baylin, S.B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 93(18), 9821-9826.

Hittelman, W.N., Kurie, J.M., Swisher, S.G. (2003). Lung cancer- Molecular Events in Lung Cancer and Implications for Prevention and Therapy. Cox JD, Hong WK, Roth JA (Ed.), 2003 Springer-Verlag New York, 281-284.

Hoedema, R., Monroe, T., Bos, C., Palmer, S., Kim, D., Marvin, M., Luchtefeld, M. (2003). Genetic testing for hereditary nonpolyposis colorectal cancer, *Am Surg*, Vol. 69(5), 387-391.

<http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/sb/kanser/pdf/kolorektal.pdf>

Huang, T.H., Perry, M.R., Laux, D.E. (1999). Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells, *Hum Mol Genet*, Vol. 8(3), 459-470.

Huang, J., Hu, N., Goldstein, A.M., Emmert-Buck, M.R., Tang, Z.Z., Roth, M.J (2000). High frequency allelic loss on chromosome 17p13.3-p11.1 in esophageal squamous cell carcinomas from a high incidence area in northern China, *Carcinogenesis*, Vol. 21, 2019–2026.

Huang, Z., Li, L., Wang, J. (2007). Hypermethylation of SFRP2 as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer and precancerous lesions, *Dig Dis Sci*, Vol. 52(9), 2287-2291.

Huelsken, J., Behrens, J. (2002). The Wnt signalling pathway, *J Cell Sci*, Vol. 115(Pt 21), 3977-3978.

Hughes, R., Cross, A.J., Pollock, J.R., Bingham, S. (2001). Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation, *Carcinogenesis*, Vol. 22(1), 199-202.

Issa, J.P. (1999). Aging, DNA methylation and cancer, *Crit Rev Oncol Hematol*, Vol. 32, 31–43.

Jacinto, F.V., Esteller, M. (2007). MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair (Amst)*. Vol. 6(8),1155-1160.

Jedrychowski, W., Maugeri, U., Pac, A., Sochacka-Tatara, E., Galas, A.(2008). Protective effect of fish consumption on colorectal cancer risk. Hospital-based case-control study in Eastern Europe, *Ann Nutr Metab*, Vol 53. 295–302.

Jones, S.E., Jomary, C. (2002). Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns, *Bioessays*, Vol. 24(9), 811-820.

Kampman, E., Slattery, M.L., Bigler, J., Leppert, M., Samowitz, W., Caan, B.J., Potter, J.D. (1999). Meat consumption, genetic susceptibility, and colon cancer risk: a United States multicenter case-control study, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, Vol. 8(1), 15-24.

- Kanai, Y., Ushijima, S., Ochiai, A., Eguchi, K., Hui, A., Hirohashi, S. (1998). DNA hypermethylation at the D17S5 locus is associated with gastric carcinogenesis, *Cancer Lett*, Vol. 122, 135–141.
- Kawakami, K., Ruzkiewicz, A., Bennett, G., Moore, J., Grieu, F., Watanabe, G., Iacopetta, B. (2006). DNA hypermethylation in the normal colonic mucosa of patients with colorectal cancer, *Br J Cancer*, Vol. 94(4), 593-598.
- Kawano, Y., Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway, *Journal of Cell Science*, Vol. 116, 2627-2634.
- Kavanagh, A.M., Giovannucci, E.L., Fuchs, C.S., Colditz, G.A. (1998). Screening endoscopy and risk of colorectal cancer in United States men, *Cancer Causes Control*, Vol. 9,455-462.
- Kaz, A.M., Brentnall, T.A. (2006). Genetic testing for colorectal cancer, *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, Vol. 3(12), 670-679.
- Khuhaprema, T., Srivatanakul, P. (2008). Colon and rectum cancer in Thailand: an overview, *Jpn J Clin*, Vol. 38(4), 237-243.
- Khulan, B., Thompson, R.F., Ye, K., Fazzari, M.J., Suzuki, M., Stasiak, E., Figueroa, M.E., Glass, J.L., Chen, Q., Montagna, C., Hatchwell, E., Selzer, R.R., Richmond, T.A., Green, R.D., Melnick, A., Grealley, J.M. (2006). Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay, *Genome Res*, Vol. 16(8), 1046-1055.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H. (2008). Tumor formation due to abnormalities in the beta-catenin-independent pathway of **Wnt** signaling, *Cancer Sci*, Vol, 99(2), 202-208.
- Kim, W.Y., Sharpless, N.E. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging, *Cell*, Vol. 127(2), 265-275.
- Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer, *Cell*, Vol. 87(2), 159-170.

Klaus, A., Birchmeier, W. (2008). Wnt signaling and its impact on development and cancer, *Nature*, Vol. 8, 387-398.

Knowles, M.A., Selby, P.J. (2005). Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer, Oxford University Press, Oxford New York, 118p.

Kranenburg, O. (2005). The KRAS oncogene: past, present, and future, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1756, 81-82.

Kressner, U., Bjørheim, J., Westring, S., Wahlberg, S.S., Pählman, L., Glimelius, B., Lindmark, G., Lindblom, A., Børresen-Dale, A.L. (1998). Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer, *Eur J Cancer*, Vol. 34(4), 518-521.

Lee, G.H. (2008). The Kras2 oncogene and mouse lung carcinogenesis, *Med Mol Morphol*, Vol. 41(4), 199-203.

Lee, M., Han, W.S., Kim, O.K., Sung, S.H., Cho, M.S., Lee, S.N., Koo, H. (2006). Prognostic value of p16INK4a and p14ARF gene hypermethylation in human colon cancer, *Pathology – Research and Practice*, Vol. 202, 415–424.

Levin, B. (2008). Genes VIII, Carlson, G. (Ed.), Pearson Prentice Hall, New York, 900-905p.

Li, H.T., Lu, Y.Y., An, Y.X., Wang, X., Zhao, Q.C. (2011). KRAS, BRAF and PIK3CA mutations in human colorectal cancer: Relationship with metastatic colorectal cancer, *Oncol Rep*, Vol. 25(6), 1691-1697.

Lièvre, A., Bachet, J.B., Le Corre, D., Boige, V., Landi, B., Emile, J.F., Côté, J.F., Tomasic, G., Penna, C., Ducreux, M., Rougier, P., Penault-Llorca, F., Laurent-Puig, P. (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer, *Cancer Res*, Vol. 66(8), 3992-3995.

Lin, J.K., Chang, S.C., Wang, H.S., Yang, S.H., Jiang, J.K., Chen, W.C., Lin, T.C., Li, A.F. (2006). Distinctive clinicopathological features of Ki-ras mutated colorectal cancers, *J Surg Oncol*, Vol. 94(3), 234-241.

Lin, Y., Stevens, C., Harrison, B., Pathuri, S., Amin, E., Hupp, T.R. (2009). The alternative splice variant of DAPK-1, s-DAPK-1, induces proteasome-independent DAPK-1 destabilization, *Mol Cell Biochem* Vol. 328(1-2), 101-107.

Lipton, L., Tomlinson, I. (2004). The multiple colorectal adenoma phenotype and MYH, a base excision repair gene, *Clin Gastroenterol Hepatol*, Vol. 2, 633–638.

Logan, C.W., Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease, *Cell Dev Bio*, Vol. 20, 781-810.

MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases, *Dev Cell*, Vol. 17(1), 9-26.

Maesawa, C., Tamura, G., Nishizuka, S., Ogasawara, S., Ishida, K., Terashima, M., Sakata, K., Sato, N., Saito, K., Satodate, R. (1996). Inactivation of the CDKN2 gene by homozygous deletion and de novo methylation is associated with advanced stage esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer Res*, Vol. 56, 3875–3878.

Mancl, E.E., Kolesar, J.M., Vermeulen, L.C. (2009). Clinical and economic value of screening for Kras mutations as predictors of response to epidermal growth factor receptor inhibitors, *Am J Health Syst Pharm*, Vol. 66(23), 2105-2112.

Manoharan, M., Ramachandran, K., Soloway, M.S., Singal, R. (2007). Epigenetic targets in the diagnosis and treatment of prostate cancer, *Int Braz J Urol*, Vol. 33(1), 11-18.

Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H. 3rd., Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., Wu, D. (2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway, *Mol Cell*, Vol. 7(4), 801-809.

Minoo, P., Baker, K., Goswami, R., Chong, G., Foulkes, W.D., Ruszkiewicz, A.R., Barker, M., Buchanan, D., Young, J., Jass, J.R. (2006). Extensive DNA methylation in normal colorectal mucosa in hyperplastic polyposis, *Gut*, Vol. 55(10), 1467-1474.

Mittag, F., Kuester, D., Vieth, M., Peters, B., Stolte, B., Roessner, A., Schneider-Stock, R. (2006). DAPK promotor methylation is an early event in colorectal carcinogenesis, *Cancer Letters*, Vol. 240, 69–75.

Moerkerk, P., Arends, J.W., van Driel, M., de Bruïne, A., de Goeij, A., ten Kate, J. (1994). Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer, *Cancer Res*, Vol. 54(13), 3376-3378.

Mohammadi-Asl, J., Larijani, B., Khorgami, Z., Tavangar, S.M., Haghpanah, V., Mehdipour, P. (2009). Prevalence of BRAF^{V600E} Mutation in Iranian Patients with Papillary Thyroid Carcinoma: A Single-Center Study, *Journal of Applied Sciences*, Vol. 19, 3593-3597.

Momparler, R.L., Bovenzi, V. (2000). DNA methylation and cancer, *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 183, 145-154.

Mori, T., Nagase, H., Horii, A., Miyoshi, Y., Shimano, T., Nakatsuru, S., Aoki, T., Arakawa, H., Yanagisawa, A., Ushio, Y., (1994). Germ-line and somatic mutations of the APC gene in patients with Turcot syndrome and analysis of APC mutations in brain tumors, *Genes Chromosomes Cancer*, 9, 168–172.

Morton, Jr R.A., Watkins, J.J., Bova, G.S., Wales, M.M., Baylin, S.B., Isaacs, W.B. (1996). Hypermethylation of chromosome 17P locus D17S5 in human prostate tissue, *J Urol*, Vol. 156, 512–516.

Morton, R.F., Hammond, E.H. (2009). ASCO Provisional Clinical Opinion: KRAS, Cetuximab, and Panitumumab-Clinical Implications in Colorectal Cancer, *J Oncol Pract*, Vol. 5(2), 71-72.

Mosavi, L., Camment, T., Desrosiers, D. and Peng, Z. (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition, *Protein Sci*, Vol. 13, 1435- 1448.

Nagasaka, T., Goel, A., Notohara, K., Takahata, T., Sasamoto, H., Uchida, T., Nishida, N., Tanaka, N., Boland, C.R., Matsubara, N. (2008). Methylation pattern of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in colon during progressive colorectal tumorigenesis, *Int J Cancer*, Vol. 122(11), 2429-2436.

Nakagawachi, T., Soejima, H., Urano, T., Zhao, W., Higashimoto, K., Satoh, Y. (2003). Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) gene expression in human cancer, *Oncogene*, Vol. 22, 8835–8844.

Namba, H., Nakashima, M., Hayashi, T., Hayashida, N., Maeda, S., Rogounovitch, T.I., Ohtsuru, A., Saenko, V.A., Kanematsu, T., Yamashita, S. (2003). Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 88 (9), 4393–4397.

Nash, G.M., Gimbel, M., Shia, J., Nathanson, D.R., Ndubuisi, M.I., Zeng, Z.S., Kemeny, N., Paty, P.B. (2010). KRAS mutation correlates with accelerated metastatic progression in patients with colorectal liver metastases, *Ann Surg Oncol*, Vol. 17(2), 572-578.

Natarajan, A.T., Vermeulen, S., Darroudi, F., Valentine, M.B., Brent, T.P., Mitra, S., Tano, K. (1992). Chromosomal localization of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) gene by in situ hybridization, *Mutagenesis*, Vol. 7 (1), 83–85.

Newcomb, P.A., Norfleet, R.G., Storer, B.E., Surawicz, T.S., Marcus, P.M. (1992). Screening sigmoidoscopy and colorectal cancer mortality, *J Natl Cancer Ins*, Vol. 84, 1572-1575.

Nicoll, G., Crichton, D.N., McDowell, H.E., Kernohan, N., Hupp, T.R., Thompson, A.M. (2001). Expression of the Hypermethylated in Cancer gene (HIC-1) is associated with good outcome in human breast cancer, *Br J Cancer*, Vol. 85, 1878–1882.

Nosho, K., Irahara, N., Shima, K., Kure, S., Kirkner, G.J., Schernhammer, E.S., Hazra, A., Hunter, D.J., Quackenbush, J., Spiegelman, D., Giovannucci, E.L., Fuchs, C.S., Ogino, S. (2008). Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample, *PLoS One*, Vol. 3(11), e3698.

Orton, J.R., Sturm, O.E., Yshemirsky, V.V., Calder, M., Gilbert, D.R., Kolch, W. (2005). Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway, *Biochem J*, Vol. 392, 249–261.

Park, J.H., Kim, N.S., Park, J.Y., Chae, Y.S., Kim, J.G., Sohn, S.K., Moon, J.H., Kang, B.W., Ryoo, H.M., Bae, S.H., Choi, G.S., Jun, S.H. (2010). MGMT -535G>T polymorphism is associated with prognosis for patients with metastatic colorectal cancer treated with oxaliplatin-based chemotherapy, *J Cancer Res Clin Oncol*, Vol. 136(8), 1135-1142.

Park, Y., Leitzmann, M.F., Subar, A.F., Hollenbeck, A., Schatzkin, A. (2009). Dairy food, calcium, and risk of cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study, *Arch Intern Med*, Vol. 169, 391–401.

Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J (1999). Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, Vol. 49, 33-64.

Patel, S.A., Graunke, D.M., and Pieper, R.O. (1997). Aberrant silencing of the CpG island-containing human O6-methylguanine DNA methyltransferase gene is associated with the loss of nucleosome like positioning, *Mol Cell Biol*, Vol. 17, 5813–5822.

Phillips, N.J., Ziegler, M.R., Radford, D.M., Fair, K.L., Steinbrueck, T., Xynos, F.P., and Donis-Keller, H. (1996). Allelic deletion on chromosome 17p13.3 in early ovarian cancer, *Cancer Res*, Vol. 56, 606–611.

Pieper, R.O., Patel, S., Ting, S.A., Futscher, B.W., and Costello, J.F. (1996). Methylation of CpG island transcription factor binding sites is unnecessary for aberrant silencing of the human MGMT gene, *J Biol Chem*, Vol. 271, 13916–13924.

Pinte S, Stankovic-Valentin N, Deltour S, Rood BR, Gue´rardel C, and Leprince D. (2004a). The tumor suppressor gene *HIC1* (Hypermethylated in Cancer 1) is a sequence-specific transcriptional repressor, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279 (37), 38313–38324.

Pinte, S., Guerardel, C., Deltour-Balerdi, S., Godwin, A.K., Leprince, D. (2004b). Identification of a second G-C-rich promoter conserved in the human, murine and rat tumor suppressor genes HIC1, *Oncogene*, Vol. 23, 4023–4031.

Poulsen, T.T., Poulsen, H.S., Pappot, H.(2008). *Molecular biology of lung cancer-Text book of lung cancer*, Hansen H. (Ed.), Informa UK Ltd., London, 29.

Ogino, S., Meyerhardt, J.A., Irahara, N., Niedzwiecki, D., Hollis, D., Saltz, L.B., Mayer, R.J., Schaefer, P., Whittom, R., Hantel, A., Benson, A.B. 3rd, Goldberg, R.M., Bertagnolli, M.M., Fuchs, C.S.; Cancer and Leukemia Group B; North Central Cancer Treatment Group; Canadian Cancer Society Research Institute; Southwest Oncology Group. (2009). KRAS mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803, *Clin Cancer Res*, Vol. 15(23), 7322-7329.

Qi, M., Elion, E.A. (2005). MAP kinase pathways, *Journal of Cell Science*, Vol. 118 (16), 3569-3572.

Qian, X.C., and Brent, T.P. (1997). Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene, *Cancer Res*. Vol. 57, 3672–3677.

Rai, K., Chidester, S., Zavala, C. V., Manos, E. J., James, S. R., Karpf, A. R., Jones, D. A., and Cairns, B. R. (2007). Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish, *Genes Dev*, Vol. 21, 261–266.

Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Velculescu, V.E. (2002). Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status, *Nature*, Vol. 29;418(6901), 934.

Rauch, T.A., Pfeifer, G.P. (2010). DNA methylation profiling using the methylated-CpG island recovery assay (MIRA), *DNA Methylation Analysis*, Vol. 52(3), 213-217.

Rennert, G., Rennert, H.S., Miron, E., Peterburg, Y. (2001). Population colorectal cancer screening with fecal occult blood test, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, Vol. 10, 1165-1168.

Riely, J.G., Marks, J., Pao, W. (2009). KRAS mutations in non-small cell lung cancer, *Proc Am Thorac Soc*, Vol. 6, 201-205.

Rocco, J.W., Sidransky, D. (2001). p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression, *Experimental Cell Research*, Vol. 264, 42–55.

Rood, B.R., Zhang, H., Weitman, D.M., Cogen, P.H. (2002). Hypermethylation of HIC-1 and 17p allelic loss in medulloblastoma, *Cancer Res*, Vol. 62, 3794–3797.

Ruas, M., and Peters, G. (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives, *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1378, 115–177.

Sakamoto, J., Fujiya, M., Okamoto, K., Nata, T., Inaba, Y., Moriichi, K., Tanabe, H., Mizukami, Y., Watari, J., Ashida, T., Kohgo, Y. (2010). Immunoprecipitation of nucleosomal DNA is a novel procedure to improve the sensitivity of serum screening for the p16 hypermethylation associated with colon cancer, *Cancer Epidemiol*, Vol. 34(2), 194-199.

Sakumi, K., Shiraishi, A., Shimizu, S., Tsuzuki, T., Ishikawa, T., Sekiguchi, M. (1997). Methylnitrosourea-induced Tumorigenesis in MGMT Gene Knockout Mice, *Cancer Research*, Vol. 5, 2415-2418.

Samowitz, W.S., Curtin, K., Schaffer, D., Robertson, M., Leppert, M., Slattery, M.L. (2000). Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study, *Cancer Epidemiol Biomarkers Pre*, Vol. 9, 1193–1197.

Samowitz, W.S. (2008). Genetic and epigenetic changes in colon cancer, *Experimental and Molecular Pathology*, 85, 64–67.

Sayed, M.G., Ahmed, A.F., Ringold, J.R., Anderson, M.E., Bair, J.L., Mitros, F.A., Lynch, H.T., Tinley, S.T., Petersen, G.M., Giardiello, F.M., Vogelstein, B., Howe, J.R. (2002). Germline SMAD4 or BMPR1A mutations and phenotype of juvenile polyposis, *Ann Surg Oncol*, Vol. 9: 901–906.

Schulz, W.A. (2005) .Molecular biology of human cancers. An advanced student's textbook, Springer, Dordrecht, 25-42 p.

Schneider- Stock, R., Boltze, C., Mittag, F. Vieth, M., Peters, B., Hartig R., Meyer F., Roessnew, A. (2004). DAPK promotor hypermethylation correlates with reduced apoptosis in colorectal cancer, *Posters: Colon/,Pathology - Research and Practice* 200 320-325

Schwarz-Romond, T., Asbrand, C., Bakkers, J., Kühl, M., Schaeffer, H.J., Huelsken, J., Behrens, J., Hammerschmidt, M., Birchmeier, W. (2002). The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase Iepsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling, *Genes Dev*, Vol. 16(16), 2073-2084.

Sedgwick, B., Bates, P.A., Paik, J., Jacobs, S.C., Lindahl, T. (2007). Repair of alkylated DNA: recent advances, *DNA Repair (Amst)*, Vol. ;6(4), 429-442.

Sekiguchi, M., Nakabeppu, Y., Sakumi, K., and Tsuzuki, T. (1996). DNA-repair methyltransferase as a molecular device for preventing mutation and cancer, *J Cancer Res Clin Oncol*, Vol. 122, 199-206.

Selby, J., Friedman, G.D., Quesenberry, C.P. Jr, Weiss, N.S. (1992). A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer, *N Engl J Med*, Vol. 326, 653-657.

Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Lin, E., Zhang, L., Guo, Y., Hernandez, N.S., Chen, X., Ahmed, S., Konishi, K., Hamilton, S.R., Issa, J.P. (2007). Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 104, 18654-18659.

Shannon, B.A., Iacopetta, B.J. (2001). Methylation of the hMLH1, p16, and MDR1 genes in colorectal carcinoma: associations with clinicopathological features, *Cancer Letters*, Vol. 167, 91-97.

Shapiro, G. I., Park, J.E., Edwards, C.D., Mao, L., Merlo, A., Sidransky, D., Ewen, M.E., Rollins, B.J. (1995). Multiple mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small cell lung cancer cell lines, *Cancer Res*, Vol. 55, 6200-6209.

Sharpless, N.E. (2005). INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus, *Mutat Res*, Vol. 576(1-2), 22-38.

Sharpless, N.E. (2005). INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus, *Mutat Res*, Vol. 576(1-2), 22-38.

Shen, L., Kondo, Y., Rosner, G.L., Xiao, L., Hernandez, N.S., Vilaythong, J., Houlihan, P.S., Krouse, R.S., Prasad, A.R., Einspahr, J.G., Buckmeier, J., Alberts, D.S., Hamilton, S.R., Issa, J.P. (2005). MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer, *J Natl Cancer Inst*, Vol. 97(18), 1330-1338.

Shohat, G., Shani, G., Eisenstein, M. and Kimchi, A. (2001). The DAP-kinase family of proteins: study of a novel group of calcium-regulated death-promoting kinases, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1600, 45- 50.

Siena, S., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Balfour, J., Bardelli, A. (2009). Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer, *J Natl Cancer Inst*, Vol. 101(19), 1308-1324.

Silber, J.R., Blank, A., Bobola, M.S., Ghatan, S., Kolstoe, D.D., Berger, M.S. (1999). O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase-deficient Phenotype in Human Gliomas: Frequency and Time to Tumor Progression after Alkylating Agent-based Chemotherapy, *Clin Cancer Res*, Vol. 5, 807.

Soares, J., Pinto, A.E., Cunha, C.V., Andre, S., Barao, I., Sousa, J.M., Cravo, M. (1999). Global DNA hypomethylation in breast carcinoma- correlation with prognostic factors and tumor progression, *Cancer*, Vol. 85, 112-118.

Spirio, L., Olschwang, S., Groden, J., Robertson, M., Samowitz, W., Joslyn, G., Gelbert, L., Thliveris, A., Carlson, M., Otterud, B. (2003) Alleles of the *APC* gene: an attenuated form of familial polyposis, *Cell*, Vol. 75, 951–957.

Srivenugopal, K.S., Yuan, X.H., Friedman, H.S., and Ali-Osman, F. (1996). Ubiquitination-dependent proteolysis of O⁶-methylguanine- DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O⁶-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, *Biochemistry*, Vol. 35, 1328–1334.

Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., Toyota, M., Tokino, T., Hinoda, Y., Imai, K., Herman, J.G., Baylin, S.B. (2004). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer, *Nat Genet*, Vol. 36(4), 417-422.

Takai, D., and Jones, P.A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22, *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, Vol. 99, 3740–3745.

Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P., He, X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction, *Nature*, Vol. 407(6803):530-535.

Tanaka, H., Deng, G., Matsuzaki, K., Kakar, S., Kim, G.E., Miura, S., Sleisenger, M.H., Kim, Y.S. (2006). BRAF mutation, CpG island methylator phenotype and microsatellite

instability occur more frequently and concordantly in mucinous than non-mucinous colorectal cancer, *Int J Cancer*, Vol. 118(11), 2765-2771.

Tanır, H.G., Demirezen, Ş. (2009). Biology of Wnt signal pathway and biomolecules which take part in this pathway: medical education, *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, Vol. 29(5), 1292-1297.

Tol, J., Punt, C.J. (2010). Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review, *Clin Ther*, Vol. 32(3), 437-453.

Trzeciaka, L., Henniga, E., Kolodziejskia, J., Nowackib, M., Ostrowskia, J. (2001). Mutations, methylation and expression of CDKN2a/p16 gene in colorectal cancer and normal colonic mucosa, *Cancer Letters*, Vol. 163, 17-23.

Turkish Ministry of Health, RSHCP, School of Public Health, National Burden of Disease and Cost- Effectiveness Study, Final Report on the Burden of Disease, 2005, Ankara.

Ushijima, T. (2005). Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells, *Nat Rev Cancer*, Vol. 5, 223-231.

Xiong, Z., Laird, P.W. (1997). COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay, *Nucleic Acids Res*, Vol. 25(12), 2532-2534.

Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D., Marais, R. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-Raf, *Cell*, Vol. 116 (6), 855–867.

Wang, D.R., Tang, D. (2008). Hypermethylated SFRP2 gene in fecal DNA is a high potential biomarker for colorectal cancer noninvasive screening, *World J Gastroenterol*, Vol. 14(4), 524-531.

Waha, A., Koch, A., Hartmann, W., Mack, H., Schramm, J., Sorensen, N., Berthold, F., Wiestler, O.D., Pietsch, T., Waha, A. (2004). Analysis of HIC-1 methylation and transcription in human ependymomas, *Int J Cancer*, Vol. 110, 542–549.

Wahab, A.H., El-Mezayen, H.A., Sharad, H., Rahman, S.A. (2011). Promoter hypermethylation of RASSF1A, MGMT, and HIC-1 genes in benign and malignant colorectal tumors, *Tumour Biol*, (baskıda)

Wales, M.M., Biel, M.A., el Deiry, W., Nelkin, B.D., Issa, J.P., Cavenee, W.K., Kuerbitz, S.J., and Baylin, S.B. (1995). p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3, *Nat Med*, Vol. 1, 570–577.

Watts, G.S., Pieper, R.O., Costello, J.F., Peng, Y.M., Dalton, W.S., and Futscher, B.W. (1997). Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene, *Mol Cell Biol*, Vol. 17, 5612–5619.

Weller, M., Stupp, R., Reifenberger, G., Brandes, A.A., Van Den Bent, M.J., Wick, W., Hegi, M.E. (2009). MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?, *Nature Reviews Neurology*, Vol. 6, 39-51.

Willert, K., Nusse, R. (1998). Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling, *Curr Opin Genet Dev*, Vol. 8(1), 95-102.

William, S.K., Cummings, M.R., *Genetik Kavramlar*, 2002, (Çeviri: Öner C.), Palme Yayıncılık, Ankara, 635-636.

Wu, C.M., Tang, R., Wang, J.Y., Changchien, C.R., Hsieh, L.L. (2005). Frequency and spectrum of K-RAS codons 12 and 13 mutations in colorectal adenocarcinomas from Taiwan, *Cancer Genet Cytogenet*, Vol. 158(1), 55-60.

Van Cutsem, E., Köhne, C.H., Láng, I., Folprecht, G., Nowacki, M.P., Cascinu, S., Shchepotin, I., Maurel, J., Cunningham, D., Tejpar, S., Schlichting, M., Zubel, A.,

Celik, I., Rougier, P., Ciardiello, F. (2011). Cetuximab Plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: Updated Analysis of Overall Survival According to Tumor KRAS and BRAF Mutation Status, *J Clin Oncol*, Vol. 29(15), 2011-2019.

Van Eldik, L.J. (2002). Structure and enzymology of a death-associated protein kinase, *TRENDS in Pharmacological Sciences*, Vol. 23 (7), 302-304.

Venesio, T., Molatore, S., Cattaneo, F., Arrigoni, A., Risio, M., Ranzani, G.N. (2004). High frequency of MYH gene mutations in a subset of patients with familial adenomatous polyposis, *Gastroenterology*, Vol. 126, 1681–1685.

Villa, E. (2000). Molecular screening for colon cancer detection, *Dig Liver Dis*, Vol. 32(2), 173-177.

Voso, M., Gumiero, D., D'alo', F., Guidi, F., Mansueto, G., Febo, A., Massini, G., Martini, M., Larocca, L., Hohaus, S. and Leone, G. (2006). DAP-kinase hypermethylation in the bone marrow of patients with follicular lymphoma, *Haematologica*, Vol. 91, 1252- 1256.

Yamaguchi, S., Asao, T., Nakamura, J., Ide, M., Kuwano, H. (2003). High frequency of DAP-kinase gene promoter methylation in colorectal cancer specimens and its identification in serum. *Cancer Lett*. Vol. 194(1), 99-105.

Yardıı, N., Mollahaliloğlu, S., akır, E. (2007). Evaluation of Turkey Ministry of Health 1983-2001 cancer incidences and cancer death rates in the burden of disease study data, *Turk J Cancer*, Vol. 37(4), 148-153.

Yee, Y.K., Tan, V.P., Chan, P., Hung, I.F., Pang, R., Wong, B.C. (2009) Epidemiology of colorectal cancer in Asia, *J Gastroenterol Hepatol*, Vol. 24(12), 1810-6.

Yen, L.C., Uen, Y.H., Wu, D.C., Lu, C.Y., Yu, F.J., Wu, I.C., Lin, S.R., Wang, J.Y. (2010). Activating KRAS mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor as independent predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab, *Ann Surg*, Vol. 251(2), 254-260.

Yokota, T., Ura, T., Shibata, N., Takahara, D., Shitara, K., Nomura, M., Kondo, C., Mizota, A., Utsunomiya, S., Muro, K., Yatabe, Y. (2011). BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer, *Br J Cancer*, Vol. 104(5), 856-862.

Zhang, H. S., Postigo, A. A., and Dean, D. C. (1999). Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition, *Cell*, Vol. 97, 53–61.

Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., Ecker, J.R. (2006). Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis, *Cell*, Vol. 126(6), 1189-1201.

Zhong, Y., Huang, Y., Huang, Y., Zhang, T., Ma, C., Zhang, S., Fan, W., Chen, H., Qian, J., Lu, D. (2010). Effects of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) polymorphisms on cancer: a meta-analysis, *Mutagenesis*, Vol. 25 (1),83–95.

Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R.K., Ballinger, T., Henikoff, S. (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription, *Nat Genet*, Vol. 39(1), 61-69.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Binnur KÖKSAL
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 05/09/1983
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, 58140-Sivas
E-posta Adresi	binnur.koksal@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Sivas Lisesi, 1999
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2004
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2007

İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi Biyolog, 2006-
Araştırma ve Uygulama
Hastanesi

Ödüller, Teşvikler ve Üvelikler

Tıbbi Biyoloji Üye, 2007-
ve Genetik Derneği

EK 1:



T.C.
Cumhuriyet Üniversitesi
TIP FAKÜLTESİ
Bilimsel Araştırmaları Değerlendirme Kurulu




Konu:
Sayı: 2010/29

21.04.2010

Karar No: 2010-01/26

Yrd.Doç.Dr.Musa SARI'nın yürütücüsü olduğu "Kolonorektal Karsinoma Tanısı Alan Hastalarda KRAS, BRAF Onkogen Yapısal Mutasyonları ve Bazı Tümör Süpresör (HIC-1, P16, DAPK1, SFRP2 ve MGMT) Genlerin Dokuya Özgü Metilasyon Profillerinin Karşılaştırılması" konulu Doktora Projesinin Bilimsel Araştırmaları Değerlendirme Kurulunca uygun olduğuna;

Karar verilmiştir.

<i>Ünvanı/Adı Soyadı</i>	<i>Üye</i>	<i>Uzmanlık Dalı</i>	<i>İmzası</i>
Prof.Dr.M.Kemal YILDIRIM	Başkan	Farmakoloji	
Prof.Dr.Dilara İÇAĞASIOĞLU	Üye	Çocuk Sağ.ve Hast.	Katılmadı
Prof.Dr.Ayhan KOYUNCU	Üye	Genel Cerrahi	Katılmadı
Doç.Dr.Sefa GÜLTÜRK	Üye	Fizyoloji	Katılmadı
Doç.Dr.Yavuz SİLİĞ	Üye	Biyokimya	
Yrd.Doç.Dr.Gülşay YILDIRIM	Üye	Deontoloji	
Yrd.Doç.Dr.Ziyet ÇINAR	Üye	Biyostatistik	