

T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANA BİLİM DALI

GENOM METİLASYON PROFİLİNİN KOLOREKTAL KANSER
ETYOLOJİSİNDEKİ ROLÜ

DR.Esra Şükran ÇAKAR
UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Prof.Dr.İlhan SEZGİN

SİVAS – 2007

Takalar geçer aklımdan, allı pullu takalar...

Sevgili Babama ve Biricik Anneme;

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fakülte Yönetim Kurulunun 12.03.2002 tarih ve 2000/1 sayılı kararı ve Cumhuriyet Üniversitesi Rektörlüğü'nün 28.03.2002 tarih ve 463 sayılı yazısı ile uygun görülen Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam esnasında çalışmamın planlanması ve metodolojik stratejilerin saptamasında bilgi ve emeğini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof.Dr.İlhan SEZGİN'e,

Tezimin başlangıcında konunun oluşumunda, yapılım sürecinde, elektroforez ve moleküler takibinde, scion image tekniğinin uygulanması aşamasında en az danışman hocam kadar katkısı bulunmuş olması nedeniyle Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR'e en derin teşekkürlerimi borç bilirim.

Laboratuar çalışmalarımda destekleri ve yardımlarından dolayı Uzman Biyolog Eylem GÜL'e ve Tıbbi Genetik laboratuar teknik elemanı Ayfer ARIKAN'a, istatistiksel verilerimi değerlendirmemdeki katkılarından dolayı Doç.Dr.Hafize SEZER'e ve hasta toplamada katkıları bulunan ve bu konuda desteğini esirgemeyen Genel Cerrahi Bölüm Başkanı hocam Prof. Dr. Metin ŞEN ve diğer hocalarıma ve Cerrahi Ana Bilim Dalı araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Patoloji Ana Bilim Dalı hocaları ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve sekreterliğine, ameliyathane sekreterliğine ve manevi desteğini esirgemeyen bölümdeki arkadaşlarıma;

Hayatımdaki her anı benimle paylaşan aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

ÖZET

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiyede ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almakta olan kanserler halen günümüzün korkutucu hastalıkları arasında olmaya devam etmektedirler. Kanserler içerisinde ise kolorektal kanserler, kadın ve erkeklerde değişen sıklıklarda en sık görülen ve ölüme sebep olan kanserlerin başında gelmektedirler. Kolorektal adenokarsinoma sürecinde genetik ve epigenetik değişimler önemli rol almaktadırlar. Genlerin fonksiyon kayıplarının oluşmasında ve anormal ürün üretmelerinde mutasyonların, delesyonların, insersiyon ve translokasyonların aktive ettiği onkogenezisle birlikte genomun yapısında değişikliğe sebep olmadan etkili olan epigenetik faktörlerin rolünün önemi yadsınamaz özelliktedir. Kolorektal kanserin etyo-patogenezinin anlaşılması kanser araştırmalarına ışık tutacağı gibi, tedavinin planlanmasında takip, prognoz, metastaz ve surveyin belirlenmesinde de yol gösterici olacaktır. Bu amaçla araştırmamız, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Bölümüne kabızlık, makattan kanama, kansızlık ve kilo kaybı şikayetleri ile başvuran ve kolorektal malignite düşünülen 23 hastaya (onam formu alınarak) uygulanmıştır. 23 hastanın 2'sine endoskopi ile polip tanısı konmuştur. Kalan 21 hastada ameliyat sonrası patoloji raporlarına göre 18'inde kolorektal kanser ve diğer 3 hastada kanser dışı inflamatuvar sebepler tespit edilmiştir. Hastalarda yaptığımız periferik kandan sitogenetik çalışmasında kontrol grubu ile karşılaştırmasında herhangi bir kromozomal sayısal ve yapısal bir anomaliye rastlanmamıştır. Bununla birlikte mikronükleus instabilitesi açısından erkeklerde hasta ve kontrol grubu arasındaki fark anlamlı iken, kadınlarda anlamlı bulunmamıştır. Aynı zamanda erkeklerde genel olarak mikronükleus oluşum sıklığı açısından yaşla ilgili bir korelasyon saptanmıştır. Epigenetik rolün kanser üzerindeki etkisini araştırmak üzere yaptığımız 23 hasta üzerindeki Msp I ve Hpa II kesim profilleri sonuçları değerlendirmesine göre aynı hastaya ait kan ve tümör dokusu arasında epigenetik zeminin farklılığı tespit edilmiş, gerek kan ve gerekse tümör dokusunda değişen oranlarda hipometilasyon ve hipermetilasyon oranları tespit edilmiştir.

Kolorektal karsinom etyolojisinde epigenetik nedenlerle giden hipermetilasyon kan DNA'sında % 8.7, doku DNA'sında % 17.4 olarak saptanırken; hipometilasyon ise kan DNA'sında % 91.3, doku DNA'sında ise % 82.6 oranında bulunmuştur. Bu etyolojik özelliklere bağlı olarak kolorektal kanserde epigenetiğin rolü olduğu gibi, çoğunluğu mutasyon, delesyon ve ailevi kalıtımla giden hipometilasyon mekanizmalarının da önemli rolü saptanmıştır. Bu da bize epigenetiğin, kanser dokusundaki değişimlerden sorumlu olabileceğini gösterirken, tümöre özgü davranışın kanser etiyolojisinin anlaşılmasında ve tedavinin planlanmasında yol gösterici olabileceği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, mikronükleus, epigenetik

SUMMARY

The cancer is the second death reason following heart disease in Turkey as in the world. Among the cancer types colorectal adenocarcinoma cancers are most common seen cancers and cause death. In colorectal adenocarcinoma cancers epigenetic play's an important role.

Epigenetic factors should be noted because: Epigenetic factors are effective eventhough they do not cause genes function loses, occurrence of abnormal produce, mutation, deletion, insertion, genome structural changes, with oncogenesis triggered by translocation.

To have knowledge of etio-pathogenesis of colorectal cancer would be enlightening for cancer research and its treatment planning, follow-up, prognosis metastasis and survey. This study is done for this purpose. 23 patients thought to be colorectal cancer and have checked in to Cumhuriyet University research and practice Hospital by symptoms of constipation, anal bleeding, anemia and weight loss were studied for the research (approval form have been taken from the patients).

2 out of 23 patients were diagnosed by polyps and 18 patients were diagnosed by colorectal cancers (based on pathological tests after their surgery) and 3 of the patients were diagnosed as not cancer but having the symptoms due to inflammation.

Our investigation for chromosomal analyses on the patients and control group were found no structural and numerical anomalies of the chromosomes. However in terms of micronucleus instability in men patients the difference with control group was significant. Same doesn't apply for women patients. Also, we found there is an correlation between micronucleus frequency and men patient's age.

The research focused in the role of epigenetic on cancer. 23 patients's profile with restricted enzymes of MspI and Hpa II have been evaluated and in same patient's blood and operative tissue sample difference of epigenetic base were found. Hypo and hypermethylations were determined also in blood and operative tissue sample.

In colorectal carcinomas hypermethylation blood went due to epigenetic etiology: %8,7 DNA, %17.4 operative tissue were determined. Hypomethylation of blood %91.3 DNA, tissue DNA is %82.6 were found.

The results of etiology not only indicates in colorectal cancer's epigenetic has role but also in majority mutation, deletion, family inheritance and hypomethylation mechanism have also an important role.

This shows us epigenetic could be responsible of changes in cancer tissue. To have knowledge of tissue behaviour could be a guiding factor in cancer etiology and treatment planning.

Key Words: Colorectal carcinoma, micronucleus, epigenetic

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|--------|
| TEŞEKKÜR | i |
| ÖZET | ii |
| SUMMARY | iv |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | ix |
| TABLolar | xi |
| ŞEKİLLER | xii |
| I.GİRİŞ ve AMAÇ | 1-2 |
| II.GENEL BİLGİLER | 3-49 |
| KOLON KANSERİ, Genel Bilgiler: | |
| Kolon kanseri ve sıklık:..... | 3 |
| Kolon kanseri ve tanı: | 3 |
| Kolorektal Kanser İçin Koruyucu ve Risk Faktörleri..... | 3 |
| Klinik Belirti ve Bulgular: | 4-6 |
| Patoloji :..... | 7 |
| Histolojik Olarak Kolorektal Kanserlerin Sınıflandırılması | 7-8 |
| Kolorektal Kanserlerin Yayılımı:..... | 8-9 |
| Evrelendirme..... | 9- 10 |
| Prognoz..... | 10 |
| Kolon Kanserinin Çok Basamaklı Doğası..... | 11-12 |
| Kolorektal Adenokarsinoma Oluşumundan Sorumlu Olan Tümör Supresör Genler: | |
| P53:..... | 12-13 |
| Adenomatözis Polipözis Koli geni (APC):..... | 3-15 |
| E-kadherin:..... | 16 |
| Beta Katenin :..... | 17 |
| Beta Katenin yolağı:..... | 17- 18 |
| Deleted Colorectal Carsinoma (DCC) geni:..... | 19 |

| | |
|--|--------|
| Kolorektal Adenokarsinoma Oluşumundan Sorumlu Olan Proto- Onkogenler:..... | 19 |
| Ras:..... | 20 |
| P16:..... | 20 |
| Kalıtısal Kolon Kanseri ve DNA Tamir Bozuklukları..... | 20- 21 |
| Kolorektal Mukoza Karsinogenezi Özetleyecek Olursak..... | 22 |
| Genomik instabilite | |
| 1-Sitogenetik Bulgular (Kanser ve Sitogenetik İlişkisi):..... | 24-25 |
| 2- Mikronükleus..... | 26 |
| Epigenetik | 26-27 |
| Epigenetik Mekanizmalarla Sessizleştirilen Genler..... | 27 |
| Epigenetik Mekanizmalar | |
| <u>Transkripsiyonel Mekanizmalar</u> | |
| A-Histon modifikasyonları | 27-31 |
| B-DNA metilasyonu | 31 |
| DNA metillenmesi/ metilasyonu ile gen ifadesinin düzenlenmesi..... | 31-32 |
| S-adenosilmetiyonin (ado-Met)..... | 32 |
| MTHFR (metilen tetra hidro folat redüktaz)..... | 33 |
| İnsan kanserlerinde DNA metilasyon değişimleri | |
| Genomik Hipermetilasyon(tümör süpresör gen inaktivasyonu)..... | 34-35 |
| DNA Metil Transferazlar (DNMT)..... | 36- 38 |
| DNA Hipometilasyonu..... | 38- 39 |
| Modifiye Restriksiyon Endonükleazlar | 39 |
| <u>Post – transkripsiyonel Mekanizmalar</u> | 39-40 |
| RNA Interference (RNAi)..... | 40 |
| DNA METİLYASYONUNUN GÖREV ALDIĞI OLAYLAR | |
| Embriyogenez..... | 41 |
| X inaktivasyonu..... | 41 |
| Genomik imprinting..... | 41 |
| Pediyatrik sendromlar ve epigenetik ilişkisi..... | 42 |
| <i>ICF sendromu</i> | 42 |
| <i>Rett sendromunda</i> | 42 |
| <i>ATRX Sendromu</i> | 42 |
| <i>Aicardi sendromu</i> | 42 |

| | |
|---|---------|
| Otoimmün hastalıklar, yaşlanma ve kanser epigenetik ilişkisi..... | 43 |
| <i>SLE</i> | 43 |
| <i>Romatoid Artrit</i> | 43 |
| Toksikoloji ve epigenetik üzerine..... | 43 |
| Kanserde Epigenetik..... | 43-44 |
| <i>Kanser tedavisi ve epigenetik</i> | 44 |
| Epigenomik | 46 |
| DNA METİLASYON ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ | 46 |
| 1-Restrüksiyon Endonukleazlara Dayanan Teknikler: | 47 |
| RLGS tekniği (Restriction landmark genome scanning)..... | 47 |
| Hibridizasyon yöntemi..... | 47 |
| HELP yöntemi (HpaII tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR)..... | 47 |
| 2-Bisüfit Tekniği: | 47 |
| Metilasyona Spesifik PCR Yöntemi (MsPCR)..... | 47- 48 |
| 3-Methlyated DNA Immunoprecipitation (MeDIP) Yöntemi: | 48 |
| ChIP çalışmaları..... | 48 |
| ChIP on chip yöntemi..... | 49 |
| Epigenom Projesi | 49 |
| III. MATERYAL VE METOD | 50- 55 |
| Hasta ve kontrol grubu..... | 50 |
| Periferik kan lenfosit kültürü..... | 50-51 |
| Tripsin-Giemsa Bandlama..... | 51-52 |
| Kandan DNA izolasyonu..... | 52 |
| Dokudan DNA izolasyonu..... | 53 |
| Restrüksiyon Enzim Tekniği..... | 53-54 |
| Agaroz Jel Elektroforez..... | 54 |
| Scion İmage jel plot tekniği..... | 55 |
| IV. BULGULAR | 56-104 |
| V.TARTIŞMA | 105-111 |
| VI. SONUÇLAR | 112-113 |
| VII. KAYNAKLAR | 114-130 |

SİMGELER ve KISALTMALAR

KRK :Kolorektal karsinoma

FAP: Familyal Adenomatosis Poliposis

HNPCC: Herediter Nonpoliposis Coli

H.PCC: Herediter Poliposis Coli

TSG: Tümör supresor gen

TNM: Tümör Lenf Nodu Metastaz

CpG: Citozin Fosfo Guanin

CIMP: CpG island(ada) metilatuar fenotipi

APC geni :Adenomatosis Poliposis Coli geni

WNT: Wingless/ Wg ve İNT-1

DCC geni: Deleted Colorectal Carcinoma geni

SAM ve Ado- Met: S- Adenozil Metionin

MTHFR: Metilen Tetra Hidro Folat Redüktaz

DNMT: DNA Metil Transferaz

HAS: Histon Asetilaz

HDAT: Histon De Açıl Transferaz

RNAİ : RNA interferans

LOH: Loose of Heterozygosite

ICF: Immün yetmezlik Sentromerik İnstabilite Fasial Dismorfizm

SLE: Sistemik Lupus Eritamatozis

PWS: Prader Willi sendromu

AS: Angelman Sendromu

BWS: Backwith Wideman sendromu

SRS: Silver –Russel Sendromu

MN : Mikronukleus

NSBC :Nucleo Spin Column

PCR:Polimeraz Zincir Reakyonu

MS-PCR: Metilasyona Spesifik PCR

RLGS : Restriction landmark genome scanning

HELP : HpaII tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR

MeDIP: Methlyated DNA Immunoprecipitation

ChIP: Chromatin immunoprecipitation

RFLP: Restriksiyon Fragment Lenght Polimorfizm

RE: Restrüksiyon endonukleaz

TABLolar

| | |
|---|-------|
| Tablo 1: Kolorektal karsinom sendromları..... | 21 |
| Tablo 2: Epigenetik Modifikasyonlar ve Hastalıklarla İlişkisi..... | 45 |
| Tablo 3: Hasta Grubunda Mikronükleus Oranları ve Tümör İlişkisi..... | 65 |
| Tablo 4: Kontrol Grubunda Mikronükleus Oranları..... | 66 |
| Tablo 5: Mikronükleus Testi için Çalışmaya Alınan Grup Değerlendirmesi..... | 66 |
| Tablo 6: Kontrol Grubunda Mikronükleus Sayımı..... | 67 |
| Tablo 7: Hasta Grubunda Mikronükleus Sayımı..... | 67 |
| Tablo 8: Mikronükleus(mn) sayımlarının istatistiki değerlendirilmesi..... | 68 |
| Tablo 9: Yaş ve mikronükleus korelasyon tablosu..... | 69 |
| Tablo10: Çalışmaya Alınan Hasta Grubu..... | 70 |
| Tablo11: Aile Hikayesi ve Kanser İlişkisi..... | 70 |
| Tablo12: Kolorektal kanserde restriksiyon enzim kesim kesim profilleri..... | 80-81 |

ŞEKİLLER

| | |
|---|----|
| Şekil 1- Kolorektal karsinomun görüldüğü lokalizasyonlar..... | 6 |
| Şekil 2- Kolorektal karsinoma tipleri..... | 6 |
| Şekil 3- Kolorektal karsinoma gelişim süreci..... | 11 |
| Şekil 4- Knudsonun 2 darbe(hit) hipotezi..... | 14 |
| Şekil 5- Wnt (Wingless) Sinyal İletim Mekanizması..... | 18 |
| Şekil 6- Onkogen Aktivasyonu İle Başlayan Tümör Oluşum Süreci..... | 23 |
| Şekil 7- Histon proteinlerinin asetilasyon ve de-asetilasyonu..... | 29 |
| Şekil 8A- Kromozom, kromatin, nükleozom metilasyon ve histon modifikasyonu ilişkisi... | 30 |
| Şekil 8B-Histonların Spesifik Modifikasyonları ve Metilasyon ile transkripsiyonun iliştilişi..... | 30 |
| Şekil 9- Sitozinin 5-metil sitozone dönüşümü..... | 32 |
| Şekil10-MTHFR'ın DNA Metilasyonu ve DNA Sentezinde Folat Metabolizmasındaki Rolü..... | 33 |
| Şekil 11- Tümör supresör gen epigenetik olarak inaktive edilmesi..... | 34 |
| Şekil 12-Tümör Supresör Gen İnaktivasyonu..... | 35 |
| Şekil 13- DNA Metil Transferaz Aracılı Metilasyon..... | 36 |
| Şekil 14- DNMT'lar ve Etki Mekanizmaları..... | 37 |
| Şekil 15- CpG ada Metilasyonu..... | 38 |
| Şekil 16- HpaII enzim çalışma mekanizması..... | 39 |
| Şekil 17- MspI enzim çalışma mekanizması..... | 40 |
| Şekil 18- Bisülfite dayalı PCR yöntemi..... | 48 |
| Şekil 19- Hasta grubu GTG Bandlama ile kromozom analizi..... | 56 |
| Şekil 20-Hasta grubunda solid bandlama ile kromozom analizi ve beraberinde zincir koloni formatında mikronukleuslar..... | 57 |
| Şekil 21-Hasta grubuna ait GTG bandlama..... | 58 |
| Şekil 22-Hasta grubuna ait mikronukleuslar..... | 58 |
| Şekil 23-Hasta grubuna ait zincir mikronükleuslar..... | 59 |
| Şekil 24- Hasta grubuna ait anafaz köprüleri..... | 59 |
| Şekil 25-Hasta grubuna ait anafaz köprüsü..... | 60 |
| Şekil 26- Kontrol grubuna ait anafaz köprüsü..... | 60 |

| | |
|--|----|
| Şekil 27- Kontrol grubuna ait nuklear tomurcuk | 61 |
| Şekil 28- Kontrol grubuna ait zincir mikronükleuslar..... | 61 |
| Şekil 29-Kontrol grubuna ait bağlı mikronukleus..... | 62 |
| Şekil 30-Kontrol grubunda bağlı mikronükleus görünümü..... | 62 |
| Şekil31-Kontrol grubunda bağlı mikronükleuslar, nuklear tomurcukların görünümü | 63 |
| Şekil 32-Kontrol grubuna ait çift nükleuslu hücre..... | 63 |
| Şekil 33- Kontrol grubu zincir şeklinde anafaz köprüleri ve mikronükleuslar | 64 |
| Şekil 34-Kontrol grubu nuklear tomurcuk..... | 64 |
| Şekil 35-Kadın hasta, kadın kontrol grubu mn sıklığı ve erkek hasta, erkek kontrol grubu mn sıklığı karşılaştırma eğrisi | 67 |
| Şekil 36- Erkek ve Kadınlarda MN Sıklığı Grafiği..... | 68 |
| Şekil 37- Hastalarda kolorektal kanserin görüldüğü bölgelerin dağılım grafiği..... | 69 |
| Şekil 38- MspI kesim, 1.jel, ilk bölüm..... | 71 |
| Şekil 39- MspI kesim, 1.jel 2.bölüm..... | 71 |
| Şekil 40- MspI kesim 2.jel, 1. bölüm..... | 72 |
| Şekil 41- MspI kesim 2.jel, 2.bölüm..... | 72 |
| Şekil 42- MspI kesim 3.jel, 1. bölüm..... | 73 |
| Şekil 43- MspI kesim 3.jel, 2. bölüm..... | 73 |
| Şekil 44- MspI kesim, 4.jel | 74 |
| Şekil 45- MspI kesim, 5.jel..... | 74 |
| Şekil 46- HpaII kesim, 1.jel, 1. bölüm..... | 75 |
| Şekil 47-HpaII kesim, 1.jel, 2. bölüm..... | 75 |
| Şekil 48- HpaII kesim, 2. jel, 1. bölüm..... | 76 |
| Şekil 49- HpaII kesim, 2. jel, 2. bölüm..... | 76 |
| Şekil 50- HpaII kesim, 3. jel, 1. bölüm..... | 77 |
| Şekil 51-HpaII kesim, 3.jel, 2. bölüm..... | 77 |
| Şekil 52- HpaII kesim, 4. jel, 1. bölüm | 78 |
| Şekil 53- HpaII kesim, 4. jel, 2.bölüm..... | 78 |
| Şekil 54- HpaII kesim 5. jel..... | 79 |

| | |
|--|----|
| Şekil 55- 1. Hasta, Müsinöz Adenokarsinom, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 82 |
| Şekil 56 -2. Hasta, Adenokarsinom Grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 83 |
| Şekil 57 - 3. Hasta, Adenokarsinom Grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 84 |
| Şekil 58 - 4. Hasta, Adenokarsinom Grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri.... | 85 |
| Şekil 59 - 5. Hasta, Müsinöz adenokarsinom Grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 86 |
| Şekil 60- 6. Hasta, Polip, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 87 |
| Şekil 61 - 7. Hasta, Lenfoid hiperplazi, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 88 |
| Şekil 62- 8. Hasta, Adenokarsinom müsinöz tip, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 89 |
| Şekil 63- 9. Hasta, Adenokarsinom orta dif., MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 90 |
| Şekil 64- 10.Hasta, Adenokarsinom grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 91 |
| Şekil 65- 11.Hasta, Adenomüsinöz karsinom gradeII, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 92 |
| Şekil 66- 12.Hasta, Adenokarsinom, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 93 |
| Şekil 67- 13.Hasta, İnflamatuar Polip, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 94 |
| Şekil 68- 14.Hasta, Adenomüsinöz karsinom grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 95 |
| Şekil 69- 15. Hasta, Adenokarsinom grade II. orta dif., MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 96 |
| Şekil 70- 16. Hasta, Adenokarsinom grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 97 |
| Şekil 71- 17. Hasta, Müsinöz adenokarsinom, orta dif., MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 98 |
| Şekil 72- 18. Hasta, Adenokarsinom grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri..... | 99 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 73- 19. Hasta, Kazeifiye Granülamatöz iltihap, MspI ve HpaII | |
| kesim jel plot görüntüleri..... | 100 |
| Şekil 74 - 20. Hasta, Müsinöz Adenokarsinom, MspI ve HpaII | |
| kesim jel plot görüntüleri..... | 101 |
| Şekil 75 - 21. Hasta, Lokal Peritonit, MspI ve HpaII | |
| kesim jel plot görüntüleri..... | 102 |
| Şekil 76 - 22. Hasta, Müsinöz Adenokarsinom, MspI ve HpaII | |
| kesim jel plot görüntüleri..... | 103 |
| Şekil 77- 23. Hasta, Adenokarsinom orta dif., MspI ve HpaII | |
| kesim jel plot görüntüleri..... | 104 |

I.GİRİŞ ve AMAÇ

Ürememeleri gereken hücrelerin çoğalmaları, kan ve lenf yoluyla vücudun diğer bölgelerine gidip orada da üremelerine devam etmeleri olan kanser, tüm dünyada olduğu gibi Türkiyede ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi'nin (IARC-International Agency for Research on Cancer) Türkiye ile ilgili 2002 verilerine göre (1), kadınlarda barsak kanseri % 9.3 ile meme kanserinden sonra ikinci sırada en sık görülen kanser türü iken, erkeklerde % 6.7 ile akciğer, mide, mesane kanserinden sonra dördüncü sırada yer almaktadır. Kansere bağlı ölüm sıklığı açısından üçüncü sırada yer almakta olan kolorektal kanserin (2) etyopatogenezinin anlaşılması kanser araştırmalarına ışık tutacağı gibi, tedavinin planmasında yol gösterici olacaktır. Bu konuda yapılan çalışmalarda epigenetik mekanizmaların kanser oluşumunda rolünün yadsınammaz özellikte olduğu düşünülmektedir. Günümüz çalışmaları dikkat çeken bir şekilde epigenetik mekanizmaların hastalıklar üzerindeki etkisi üzerine yoğunlaşmaya başlamıştır. Genlerin fonksiyon kayıplarının oluşmasında ve anormal ürün üretmelerinde mutasyonların, delesyonların, insersiyon ve translokasyonların aktive ettiği onkogenezinin önemi yanında genomun yapısında değişikliğe sebep olmadan etkili olan epigenetik faktörlerin rolünün önemi anlaşılmaya başlanmış ve son yıllardaki çalışmaları bu konu üzerine çekmiştir.

Kanser oluşumunda tümör supresör genlerin ve de proto-onkogenlerin arasındaki dengenin bozulması ve olayı tetikleyen ve kanser kaskadını ilerleten mekanizmalar bulunmaktadır. Tümör supresör genlerin inaktivasyonu ile proto-onkogenlerin aktive edildiği mekanizmalar etyolojiden sorumlu tutulmaktadır. Bu konuda nasıl sorusu araştırmacıları meşgul etmektedir. Tıpkı kolorektal kanserinde olduğu gibi. Kolorektal karsinoma, mukoza adenoma-karsinoma sürecinde, genetik ve epigenetik değişimler önemli rol almaktadırlar.

Karsinogenezis tümöre özgü genlerde çok çeşitli basamaklarla meydana gelmektedir. Karsinogenezis sürecindeki bu basamaklardan biri mutasyonlar iken diğeri heterozigozite kaybıdır. Epigenetik değişimler heterozigozite kaybına onkogen aktivasyonu ya da tümör supresör gen inaktivasyonuna sebep olmaktadır (3).

Pek çok kanser türünde olduğu gibi kolorektal karsinomada da kromozomal instabilitenin rolü büyüktür. Aynı zamanda genomik instabiliteyi gösteren mikronükleus oluşumu da gözlenmektedir.

Bu çalışma ile kolorektal kanser etyopatogenezine ışık tutması amacıyla hastalardan kromozom analizi yapılarak kromozomal instabilite, mikronükleus oranları belirlenerek kanser hastalarımızda genomik instabilitedeki rolü, adenoma karsinoma sürecindeki epigenetik olarak kan ve kanser dokusu arasında modifiye metilasyona spesifik restriksiyon enzimler olan MspI ve Hpa II arasındaki metilasyon farklılığı ortaya konarak tümör dokusuna özgü olan epigenetik değişikliklerin, aynı hastalara ait periferik kan dokusuna ait farklılıklarının ortaya konulması hedeflenmiştir.

II. GENEL BİLGİLER

KOLON KANSERİ

Genel Bilgiler:

Kolon kanseri ve sıklık: Türkiye Kanser Savaş Vakfı (TKSV) temmuz 2006 verilerine göre kolorektal kanserler erişkinlerde çok sık rastlanan tümörlerdendir. Genel olarak sanayileşmiş ülkelerde tüm kanserlerin %13 kadarını oluşturur. Dünya Sağlık Örgütü rakamlarına göre en yüksek sıklık, erkeklerde 34/100.000 kadınlarda 27/100.000 ile, ABD'nin bir bölgesindedir. En düşük sıklık 0.2/100.000 ile Kuveyt'tedir. Ülkemizde yeterli güvenilirlikte olmayan sayılara göre, 1.93/100.000 düzeyindedir. Kolon kanserinde dikkati çeken konulardan bir tanesi de cinsiyet dağılımındaki farklardır ve erkeklerde daha sık görülmektedir (4).

Kolon kanseri ve tanı: Kolon kanserinde uzun yaşam süresi sağlanabilmesi erken tanı ile mümkündür. Genellikle şikayetler üst düzeye geldiğinde hastalık ilerlemiş durumdadır. Erken tanı için toplumun bilgilendirilmesi ve taramalar önemlidir. Özellikle yüksek riskli hastalarda taramalar daha çok değer taşımaktadır. Bütün sindirim kanalı kanserleri tanısında ve tedavi sonrası izleminde endoskopi ve radyolojik görüntüleme en önemli yöntemlerdir (5). Kolon kanseri tanısı ve hatta hastalığın tedavi sonrası izlenmesinde kanda yapılan bazı testler tümör markırları (tümör belirleyiciler) değer taşıyabilir (6). Tanıda klinik bulguların da önemli yeri vardır.

Kolorektal Kanser İçin Koruyucu ve Risk Faktörleri

Kolorektal karsinoma etyopatogenezinde genetik zemin olduğu gibi çevresel faktörlerin de etkisi vardır. İleri derecede risk faktörleri; ileri yaş, doğum yeri (Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa, Asya, Afrika), Familial polipozis/Gardner sendromu, Herediter nonpolipozis kolorektal kanser, uzun süreli ülseratif kolitken, orta derecede risk faktörleri ise yüksek kırmızı et içeren diyetle beslenme tarzı, daha önce adenom hikayesi olması, pelvik radyoterapi uygulanmış olmasıdır. Zayıf risk faktörleri ise; yüksek yağ içeren diyetle beslenme tarzı, alkol ve sigara içilmesi, obezite, uzun boy, kolesistektomi

ameliyatı, yüksek sukroz tüketimi olarak gösterilmiştir. Koruyuculuk değeri az olan faktörler ise yüksek sebze /meyve içeren diyet, yüksek folat/metionin alımı, yüksek kalsiyum alımı, postmenopozal hormon replasman tedavisi iken aspirinin ise koruyuculuk değeri orta derecededir (7,8).

Klinik Belirti ve Bulgular

Kolorektal kanserler nispeten yavaş büyüyen neoplazmalar olup, klinik belirti ve bulgular tümörün lokalizasyonuna göre değişir.

Sağ kolon tümörleri daha sinsi seyredir. Semptomatik hale gelmesi sol kolon ve rektum tümörlerine göre daha geç olmaktadır. Sağ kolonun çapı daha geniş ve bu bölge tümörleri daha çok polipoid şekilde lümen içine doğru büyüdükleri için belirtiler geç ortaya çıkmaktadır. Çabuk yorulma, çarpıntı hissi, anjinal nöbetler veya konjestif kalp yetmezliği bulguları kolorektal tümörlerde sinsi ve yavaş giden kanama sonucu gelişen demir eksikliği anemisine bağlı belirtilerdir. Sağ kolon tümörlerinde kanama çoğu kez az miktarda yavaş olmakta ve hipokrom mikrositer tipte anemi gelişmektedir. Hastaların bir kısmında anemi etyolojisi araştırılırken tanı konmaktadır. Bu hastalarda gaitada gizli kan sık olarak pozitif bulunmaktadır. Tümör büyüdükçe karında dolgunluk hissi artar ve bazen hastalar kitle hissedebilirler. Sağda çapın geniş olması yanında kolon içeriği daha fazla sıvı taşıdığı için tıkanma ve buna ait bulgular çok seyrekdir. Kilo kaybı sağ kolon kanserlerinde daha belirgindir. Ancak tümöral kitle ileo-çekal valv bölgesini tutarsa, karında yaygın distansiyon, karın ağrısı, bulantı ve kusma şeklinde intestinal tıkanma tablosu meydana gelebilir.

Sol kolon kanserlerinde; kolonun çapı daha dar ve dışkı daha katı olduğundan, barsak içeriği daha şekilli ve tümörleri daha çok annüler büyüme gösterdikleri için tıkanmaya ait belirtiler daha egemendir. Başlangıçta dışkılama alışkanlığında değişme ile konstipasyon görülür. Tümörün proksimalindeki distansiyona bağlı olarak intermittant kramp tarzında ağrı vardır. Ağrılar genellikle yemek sonrası artma gösterirler. Kabızlık için müshil alan hastalarda da ağrının arttığı görülür. Bazı hastalarda dışkı çapında incelme ve sayısında artış şeklinde değişiklikler görülebilir. Sol kolon ve rektal tümörlerde; hematokezya sık bir bulgudur. Hematokezya gaitayla karışık veya gaitaya sıvaşık halde, parlak kırmızı,

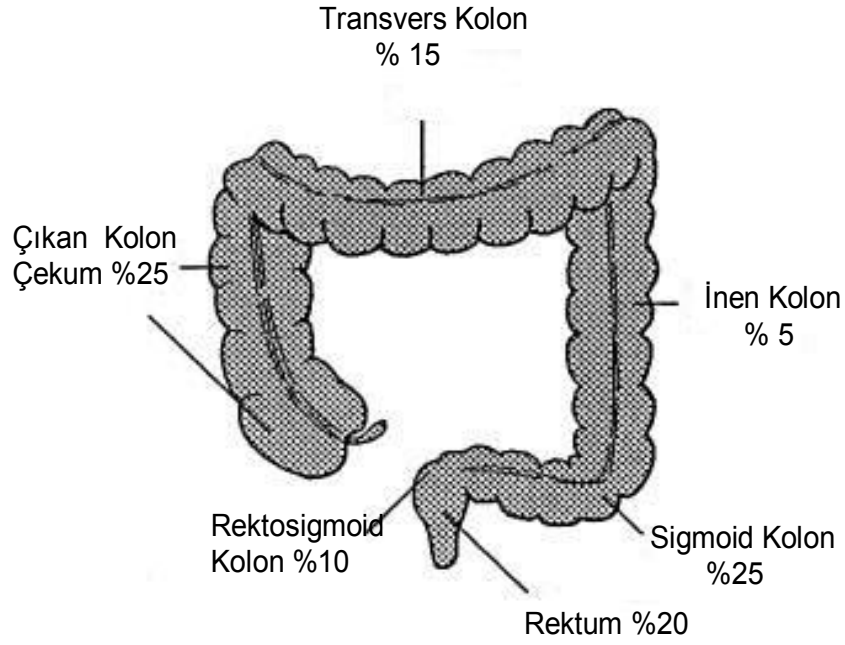
taze kan şeklindedir. Fazla miktarda kanama genellikle göstermez. Tümör distale yaklaştıkça kanama görülme sıklığı artmaktadır.

Rektal kanserlerde karakteristik olarak, sık dışkılama ihtiyacı, rahatlayamama, tenezm hali, gaita çapında incelme, hacminde azalma ve anal inkontinans ile az miktarda parlak kırmızı kan görülür. Prolapsus ile tümöral kitlenin hasta tarafından hissedilmesi veya görülmesi de mümkündür. Geç devrede komşu organ tutulumuna bağlı perineal veya sakral bölge ağrıları görülebilir. Ülseratif şeklinde gelişen kanserlerde ara sıra lokalize apse halinde kapalı perforasyon ve daha seyrek olarak da yaygın peritonit gelişebileceği bildirilmiştir.

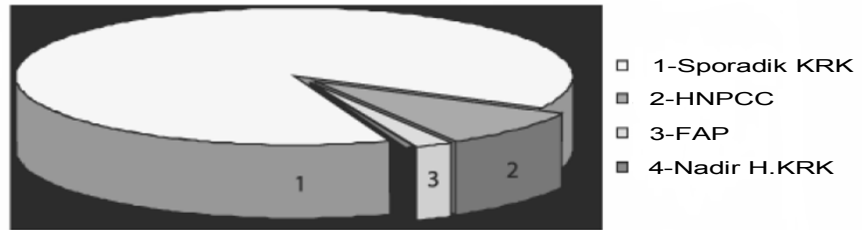
Kanserlerin ileri evrelerinde; iştahsızlık, kilo kaybı, çabuk yorulma gibi genel belirtiler olağandır. Peritoneal yayılıma bağlı olarak malign asit ortaya çıkabilir. Karaciğer yayılımına bağlı sağ üst kadranda ağrısı, kitle veya sarılık ile pulmoner yayılıma bağlı öksürük ve dispne görülebilir.

Hastalığın başlangıcında şikayetler belirsiz ve intermittant olduğu için gerek hasta gerekse hekim üzerinde durmayabilir ve küratif cerrahi rezeksiyon için kıymetli olan süre geçebilir. Özellikle 40 yaş üzerinde bir hastada; demir eksikliği anemisi varsa, çok az miktarda da olsa gaitada kan tarif ediyorsa, gaita çapında veya dışkılama alışkanlığında değişiklik hikayesi veriyorsa kolorektal kanser olabileceği düşünülmeli ve araştırılmalıdır. İnflamatuvar barsak hastalığı veya ailesel kolon kanseri hikayesi olanlarda; izah edilemeyen karın ağrısı, kilo kaybı, genel durumda bozulma veya tıbbi tedaviye cevapsızlık hallerinde de kolon kanseri mutlaka hatırlanmalı ve ekarte edilmelidir (9).

Aşağıdaki şemalarda kolorektal kanserin yerleşim yerleri (şekil -1) ve tipleri (şekil-2)' de gösterilmiştir.



Şekil 1- Kolorektal karsinomun görüldüğü lokalizasyonlar



Şekil 2- Kolorektal karsinoma tipleri: 1-Sporadik korektal karsinoma 2- Herediter Nonpolipozis Kolorektal Karsinoma(HNPCC) 3- Ailesel Adenomatosis Polipozis (FAP) 4- Nadir görülen Herediter Kolorektal karsinoma (H.KRK) .

Patoloji :

Kolon kanserleri mikroskopik olarak; polipoid (eksofitik), ülseratif ve infiltratif veya annüler (skiro) şekillerde görülürler. Polipoid tip lümen içine doğru ve genellikle bir duvar boyunca gelişirler. Sağ kolon ve özellikle çekum tümörleri sıklıkla polipoid kitleler halinde gelişirler ve baryumlu kolon grafilerinde büyük dolma defekti şeklinde görünüm oluştururlar.

İnfiltratif tipte tümör barsak duvarı içine doğru büyür ve tümör bütün barsak duvar katlarını tutabilir. Annüler (infiltratif-skiröz) tipte büyüme dairesel şekilde olur ve lümeni çepeçevre sarar. Radyolojik olarak halka şeklinde (napkin ring) görüntü meydana getirirler. Sol kolon tümörleri sıklıkla infiltratif tipte olup annüler gelişim gösterirler. Böylece barsak alışkanlıklarında değişme, tıkanma ve kanama gibi semptom ve belirtiler daha sık görülür. Tümörler bazen ülserler şeklinde görülebilirler. Bu tip tümörlerde kanama yanında perforasyon daha sıktır.

Kolorektal kanserlerin %95 gibi büyük bir kısmını adenokarsinomalar oluşturur. Adenokarsinomalar kolumnar veya küboidal epitelden gelişen kısmen iyi farklılaşmış bezlerden meydana gelirler. Hücre dışı müsin teşekkülü ile birlikte olan kanserlere müsinöz veya kolloid kanser adı verirler. Bu grup, kolorektal kanserlerin %5 kadarını teşkil etmektedir. Bir kısım kanserlerde ise müsin birikimi intrasitoplazmiktir ve hücre içinde biriken müsin hücre çekirdeğini bir kenara iterek hücreye taşlı yüzük görünümü verir ki bunlara “Taşlı Yüzük Hücreli Kanser” adı verilmektedir. Diğer epitelyal kanserler çok nadir görülen tiplerdir. Epitelyal kökenli olmayan kanserler ise bütün kolon kanserlerinin %1’ inden azını teşkil ederler. Histopatolojik olarak epitelyal, endokrin, non-epitelyal, malign lenfoma ve sekonder tümörler olarak sınıflandırılmıştır (10).

Histolojik Olarak Kolorektal Kanserlerin Sınıflandırılması

Kolorektal Kanserler:

A- Epitelyal Tümörler

- Adenokarsinoma
- Müsinöz adenokarsinoma
- Taşlı yüzük hücreli karsinoma
- Squamöz hücreli karsinoma
- Adenosquamöz karsinoma

- Küçük hücreli (oat-cell) karsinoma

- Diğer karsinomalar

B- Endokrin Tümörler

- Karsinoid tümör

- Mikst karsinoid-adenokarsinoma

C- Non-Epityyal Tümörler

- Leyomiyosarkoma

- Kaposi sarkomu

- Diğerleri

D- Malign lenfomalar

E- Sekonder tümörler

Kolorektal Kanserlerin Yayılımı :

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

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

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

Hematojen Yayılım : En sık yayılım bölgesi portal ven yoluyla karaciğerdir. Karaciğerden sonra akciğerlere de yayılım olabilmektedir. Karaciğer ve akciğer metastazı olmadan diğer organlara hematojen yayılım çok nadirdir. Rektal kanserlerde; 1/3 alt rektum kanserleri süperior hemoroidal ven ile karaciğere hematojen metastaz yaparlarken, orta hemoroidal ven ve inferior vena kava yoluyla akciğerlere erken

hematojen yayılım gösterebilirler. 2/3 üst kısım kanserleri ise sadece karaciğere metastaz yaparlar. Portal sistem ile vertebral venler arasındaki anastomozlar nedeniyle arasıra lomber ve torasik vertebra metastazları görülebilir.

İmplantasyon ile Yayılım : Primer tümör hücrelerinin diğer bir yüzeyde lezyon meydana getirmeleridir. İntralüminal yayılım ile tümör hücrelerinin daha distalde bulunan bir fistül, ülser, hemoroid veya apse üzerine implante olabileceği bildirilmiştir. Serozal yüzeyden periton yayılımı olabilir ve peritoneal karsinomatozis gelişebilir. Cerrahi manipulasyonlar nedeniyle dikiş hattında %10 oranında rekürrens tarif edilmiştir (9).

Evrelendirme:

Kolon kanserlerinin yayılımı prognoz açısından son derece önemli olup bunu tanımlamak için değişik evrelendirmeler yapılmıştır (11,12). En sık kullanılan DUKES evrelemesidir.

Dukes Evrelemesi

Evre A: Muskularis propria tabakasına kadar invazyon

Evre B: Tüm barsak duvarı tutulumu, lenf nodu metastazı yok

Evre C: lenf nodu metastazı (duvar tutulumuna bakılmaz)

C1- Barsağa komşu lenf nodu

C2- Damarlar boyunca lenf nodu

Kolon kanseri-TNM (T: Tümör sınıflaması, N: Lenf Nodu, M: Metastaz)

T0 Karsinoma in situ

T1 Muskularis propriaya kadar yayılım

T2 Tüm barsak duvarı tutulmuş

T3 Lenf nodu metastazı var

T4 Uzak metastaz

Nx- değerlendirilemeyen lenf nodu

No- Lenf nodu metastazı yok

N1- 1-3 peri kolik lenf tutulumu

N2- 2-4 perikolik ve perirektal tutulum

N3- damarlar boyunca

Mx- Uzak metastazı değerlendirilemeyen

M1- Uzak metastazı yok.

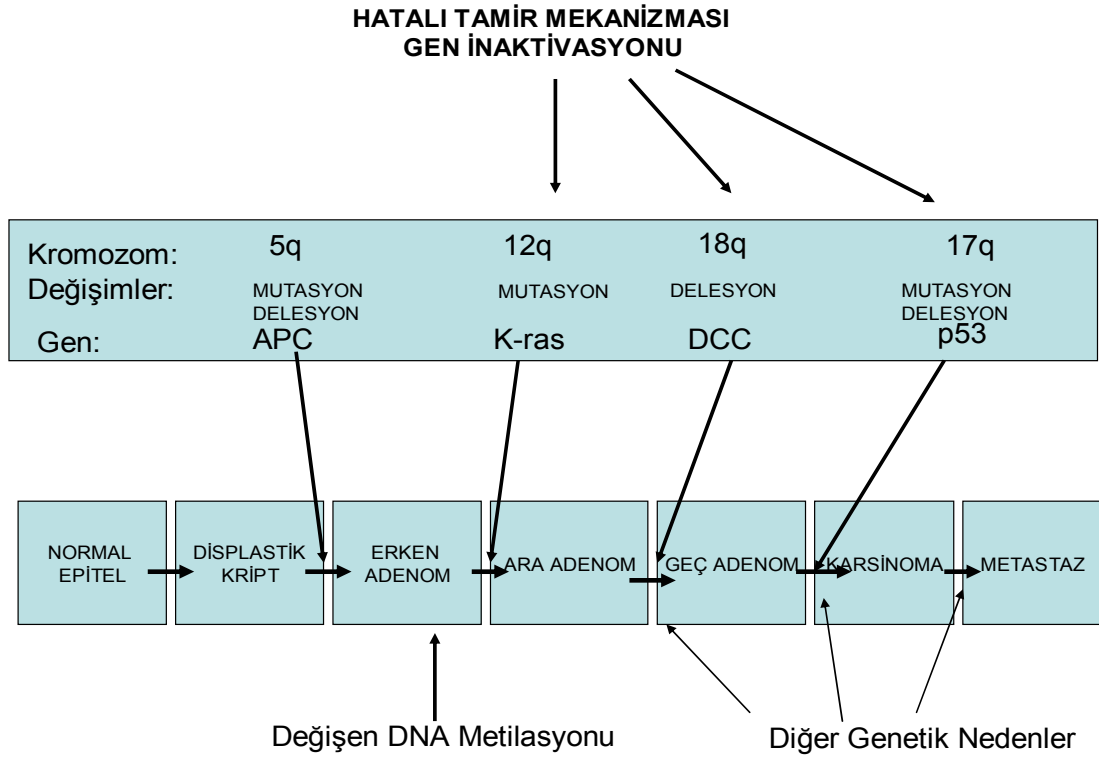
M2- Uzak metastaz

Kolorektal Kanser Evrelemesinde Dukes ile TNM Sınıflamasının Eşleştirilmesi (11,12)

| Dukes Evreleri | TNM Evreleri | İnvazyon Durumu |
|-----------------------|--|---|
| A-Evresi | T ₁ N ₀ M ₀ | Tümör mukoza ve submukoza sınırlı |
| | T ₂ N ₀ M ₀ | Tümör muskularis propriya ulaşmış |
| B-Evresi | T ₃ N ₀ M ₀ | Tümör serozaya ulaşmış |
| | T ₄ N ₀ M ₀ | Komşu organ tutulumu vardır. |
| C-Evresi | T ₍₁₋₄₎ N ₁ M ₀ | 1-3 bölgesel lenf düğümü tutulumu vardır. |
| D-Evresi | T ₍₁₋₄₎ N ₍₁₋₂₎ M ₁₋₂ | Uzak metastaz vardır. |

Prognoz

Prognoz kolorektal kanserin patolojik evresi yani invazyon derinliği ve histolojik diferansiyasyonu ile paralellik gösterir. Modifiye Dukes sınıflamasına göre 5 yıllık sağ kalım; Evre A için % 90, Evre B1 için % 85, Evre B2 için % 70-80, Evre C için % 35-65 ve Evre D için % 5-15 kadardır. Cerrahi uygulandığında karaciğer metastazı var ise ortalama yaşam süresi sadece 4.5 aydır. Kolorektal adenokanserlerin % 80'den fazlası iyi veya orta derecede diferansiye tümörlerdir ve tümör rekürrensi için tanımlanmış belirleyicileri yoktur. Geri kalan adenokanserler kötü diferansiye ve kolloid (veya müsinöz) tümörlerdir ve bunlarda 5 yıllık sağ kalım oranları diferansiye olanlara göre nispeten daha kötüdür (13).



Şekil 3- Kolorektal karsinoma gelişim süreci

Kolon kanseri bir dizi mutasyon sonucu oluşur

Kolorektal kanserler üzerinde pek çok çalışma yapılmış ve bu çalışmaların neticesinde kolon kanseri gelişiminde iki görüş ortaya çıkmıştır. Birinci olarak malign (kötü huylu) ve benign (iyi huylu) tümörlerden doğrudan gelişmesidir. İkinci olarak da pek çok farklı kanser öncesi evrelerin var olmasıdır. Pek çok evrenin bir arada olması ile bu farklı evrelerin ayırt edilerek ayrı ayrı çalışılabilmesine olanak sağlamıştır (14).

Kolon Kanserinin Çok Basamaklı Doğası

Çeşitli tümörlerdeki mutasyon analizleri sonucunda normal bağırsak epitel hücrelerinin tümör hücrelerine dönüşmesinden sorumlu olan genetik basamakların sayısı ve doğası saptanabilmiştir. Kolon kanseri için genetik model oluşturulmasını sağlayan böyle bir analiz Şekil 3’ de gösterilmiştir. Bu modellerin birinci özelliği malign gelişime sebep olan dört ya da beş farklı gende özgül mutasyonların gerekliliğidir. Eğer daha az sayıda gende mutasyon meydana gelirse, ya tümör oluşumunda bir ara basamak meydana gelir ya da iyi huylu bir tümör oluşumu gözlenir. İkinci özelliği ise mutasyonların şekilde belirtilen bir sıraya göre meydana gelmesidir. Ancak esas olan ya da önemli olan,

mutasyonların belirli bir sıra ile oluşmaları değil, özgül mutasyonların bir arada oluşmasıdır. İlk mutasyon normal epitelium hücresinde meydana gelir. FAP vakalarında meydana gelen ilk mutasyon kalıttır. Kolon ve rektum üzerinde düzinelerce veya yüzlerce iyi huylu adenomların oluşmasına sebep olur. Kendiliğinden oluşan vakalarda, başlatıcı mutasyonun tek bir hücrede meydana geldiği ve adenomdaki tüm hücrelerin bu hücrenin sahip olduğu mutasyonu taşıdığı belirlenmiştir. İlk mutasyon 5. kromozomun uzun kolunda yerleşmiş olan APC geninde oluşur (15). Kromozom 5'in homolog kopyasında bulunan karşı allelin kaybı hücre çoğalması adenom oluşumu için şart değildir. Birbirine bağlı olarak oluşan mutasyonların sırası şekil 3'de görülmektedir. Ras onkogeninde oluşan mutasyonlar ya daha önceden ya da kromozom 18p'nin segmentinin birinin kaybı sonucu oluşabilir. Kromozom 5'de önceden varolan bir mutasyonla birlikte adenom hücrelerdeki her iki mutasyonun bir araya gelmesi, adenomun daha da büyümesine ve parmak benzeri ince çıkıntıların gelişmesine sebep olur. Sonunda da, p53'ün inaktivasyonundan ya da kaybından sorumlu olan 17p'deki bir mutasyon, kanserli hücreye geçişe neden olur. P53'ün normal alleli, hücrelerin G1 evresinden S evresine geçişini düzenleyen bir tümör supresör genidir (16). Kolon kanseri oluşuktan sonra metastaz ortaya çıkar ve bu metastaz bilinmeyen sayıda bir dizi mutasyonel basamaktan oluşur (17).

Kolorektal Adenokarsinoma Oluşumundan Sorumlu Olan Tümör Supresör

Genler:

Kanser oluşumunu önleyen genler olup, kolorektal kanser oluşumundan sorumlu olan tümör supresör genler p53, APC, DCC genleri olarak sayılabilir.

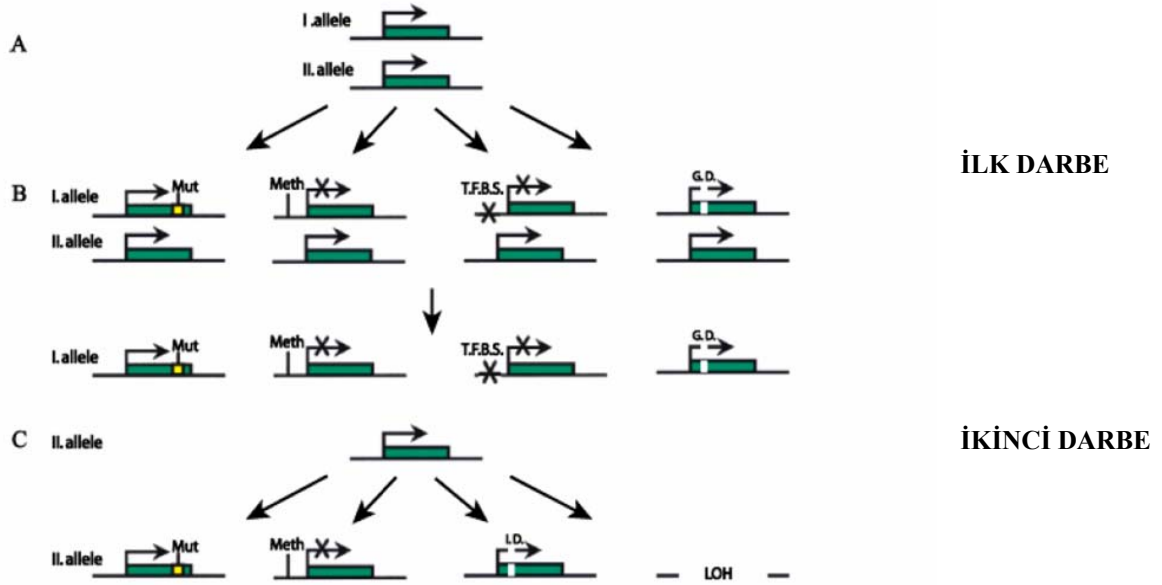
P53: İnsan kanserlerinde en sık görülen mutant gen olup, 17p13 lokusuna yerleşmiştir. Tüm kanselerin %50'sinde görülmektedir. P53 proteininin hücre fonksiyonlarındaki rolü; gen transkripsiyonu, DNA sentez ve tamiri, genetik stabilitenin korunması, hücre siklusunun duraklatılması, büyümeyi sonlandırma ve programlı hücre ölümüdür (18). DNA hasar ve hipoksemi p53 üretimini uyarır ve P53 gen fonksiyon kaybı sonucunda hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkar ve DNA tamiri yapılmaksızın hücre siklusu kontrolsüz olarak çoğalır. Normal bir hücrede DNA hasarı olduğunda, P53 geni genomik stabiliteyi sağlar ve hücre siklusunu G1'de inhibe eder. Böylece hücreye tamir için zaman kazandırır. Eğer hasar tamir edilemiyorsa hücre apoptoza uğratılır. P53 mutasyonlarında hücreler bölünmeye devam ederler. P53

fonksiyon kayıpları genellikle allelik kayıplar ve germline ve missens mutasyonlar şeklindedir(19). Sporadik kolorektal karsinomalarda 17p LOH kaybı gösterilmiştir. Erken evre lezyonlarının ileri evre lezyonlarına dönüşümünden sorumlu olmaktadır (16,19).

Adenomatosis Poliposis Koli geni (APC)

İlk defa 1987 yılında kromozom üzerinde 5q 21-22 bölgesinde haritalanmıştır (20). Daha sonra 1991 yılında Amerika ve Japonya'da çeşitli araştırma laboratuvarlarında klonlanmış, tanımlanarak karakterize edilmiştir (15, 21,22,23). Hatta daha da önemli olarak APC gen mutasyonu, sporadik kolorektal kanserlerde bulunmuştur (24, 25, 26).

Kolorektal kanserin adenoma karsinoma oluşum sürecinin erken evrelerinde APC mutasyonu 1996 yılında Kinzler ve Vogelstein tarafından tespit edilmiştir (27). Sporadik ve FAP poliplerinde APC gen mutasyon analizi yapılmış her iki allelde mutasyon gösterilmiştir (28, 29). Böylelikle Knudson'un 1971 yılında kanser oluşumunda ileri sürdüğü tümör supresör genlerin ikili basamakla inhibe olması hipotezi desteklenmiş oldu. Kanser oluşumu için tümör supresör geninin her iki allelinin de etkilenmesi gerekir. Bu olay Knudson'ın 1971 yılında hereditör retinoblastomaya ilişkin istatistiksel gözlemlere dayanarak ortaya attığı "iki vuruş hipotezi" ile açıklanır (30). Daha sonraki yıllarda moleküler çalışmaların da gösterdiği gibi onkogenез sırasında bir tümör supresör geninin önce bir daha sonra da ikinci alleli nokta mutasyonu, gen delesyonu ya da imprinting gibi mekanizmalarla inaktive olmaktadır. Germline mutasyon birinci vuruş, somatik mutasyon ikinci vuruşla tümör supresör gende fonksiyon kaybı görülmektedir. İlk mutasyon genelde nokta mutasyon şeklinde iken diğer allelde ise kromozomun bir kısmında ya da tamamında delesyon meydana gelmektedir. Bu olaya heterozigozite kaybı denilmektedir (LOH = Loose of heterozygosity). Burada onkogenезis resesiftir. Normal olan allel kanser oluşumunu suprese edebilir. Kansere yatkınlık ise otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır. Penetrans azalması ile bazen kanser oluşumu kuşak atlayabilir. Bu yüzden taşıyıcıların ortaya çıkarılması mümkün olmayabilir ama hastalık gelecek kuşaklara geçmeye devam edebilir (31, 32).



Şekil 4- Knudsonun 2 darbe(hit) hipotezi: Tümör supresör genlerin ve mismatch repair genlerinin allelik inaktivasyonun şematik olarak gösterilmesi. **A:** Normal transkribe olan gen 1. ve 2. alleli **B:** 4 farklı genetik değişim (mutasyon, promotor metilasyonu, alternatif transkripsiyon bağlayan domain, genomik delesyon) 1. allelde inaktivasyona sebep olarak ilk darbe oluşturur ve herediter kanser oluşmasına sebep olur. **C:** ikinci allelde somatik hücrede meydana gelen inaktivasyon ile tamamen gende transkripsiyon inaktivasyonu meydana gelir. (Mut.-mutation; Meth.-promoter methylation ; T.F.B.S.-transcription factor binding site; G.D.-genomic deletion; I.D.-intragenic deletion and LOH- loss of heterozygosity) (33).

APC geni bir tümör supresör gen olup, insanda kolorektal kanser yanısıra FAP, tiroid, gastrointestinal sistem tümörleri, beyin tümörleri, fundus lezyonları, pankreatik, özefajial, hepatik karsinomalarda da etkili olan 5q21-22 'de lokalize olan bir genidir. Hücrenin apoptosise girmesinde ve hücre siklusunun durdurulmasında rol alır (3, 34, 35). APC gen ürünü homodimerik bir proteindir.Hücre stoplazması ve nükleusunda yer almaktadır. Beta katenini bağlar ve onu inaktive eder. WNT (Wg:Wigless) sinyal yolağında yer alan çok önemli bir tümör supresör genidir (36). Tüm aiesel geçişli ve sporadik kanserlere eşlik etmektedir. APC geninin fonksiyon kaybı özellikle familial adenomatosis poliposis coli ve sporadik kolon kanserlerinde ve promotor hipermetilasyonu çeşitli kanserlerde gösterilmiştir (36,37,38,39,40). WNT sinyal yolağı

kanser gelişimde önemlidir. Kolorektal karsinomada APC gen mutasyonu sıktır bunun yanında %18'lik bir oranda da APC promoter hipermetilasyonu gösterilmiştir (40, 41).

Tümör supresör genler onkogeneze yapısal bir nokta mutasyon ya da epigenetik modifikasyonla katkı yaparlar. Epigenetik olarak promoter 5'CpG bölgesinin metilasyonu ile tümör supresör genlerin transkripsiyonel faktörlerinin susturulması kanser gelişiminde çok önemli bir yere sahiptir. Bir çok kanser türünde promoter hipermetilasyonu gösterilmiştir. Normal kolonik mukozada CpG adacıklarında metilasyon oranı düşüktür. Bu oran yaşla beraber artma eğilimindedir (42).

Adenomatosis poliposis coli geni (APC) 8535 base pair (bp) uzunluğundadır ve 2843 aminoasitli (aa) multidomain bir proteini kodlar. Exon 15, APC gen sekansının %75' ini kodlar. Germline ve somatik mutasyonların %75'inden daha fazlasından bu exon sorumludur. Bu gendeki mutasyonların %95'inin sebebi nonsens ve çerçeve kayma mutasyonudur (30,43, 44).

Adenomatosis Poliposis Coli (APC) geni, beta-katenin seviyesini düzenleyen Wnt sinyal yolağının bir üyesidir. Çok çeşitli tümörlerde beta katenin seviyesinin değiştiğini görmekteyiz. APC geninin kontrolünün azalması ile birlikte stoplazmada bulunan beta katenin seviyesinin kararlılığı bozulur ve de nükleusa girişinin artımıyla beraber tümöregenezis kaskadı çalışmaya başlar. APC geni diğer sellüler proteinlerle de ilişki halindedir. Bu proteinler axin 2 (AXIN2), plakoglobin (JUP), Asef (ARHGEF4), kinezin ailesiyle bağıntılı protein3 (KIFAP3), EB1(MAPRE1), mikrotübüller ve drosofiladaki disk large geninin insandaki homoloğu olan DLG1'dir. Bu proteinlerle olan karşılıklı işbirliği ile APC geni hücrede pek çok olayın düzenlenmesinde görev alır ; intersellüler adezyon, hücre iskelet organizasyonu, plakoglobin seviyelerinin düzenlenmesi, hücre siklusunun regülasyonu ve apoptozis, kök hücre bölünmesi ve oryantasyonu ve hücre polarizasyonunun düzenlenmesinde rolü vardır (46).

Yapılan deneysel sıçan çalışmalarında, APC geninde BAC vektör aracılı çalışmalarda heterozigot mutasyon oluşturulmuş embriyolarda kısa barsakta adenomatöz polipler gelişmiş, homozigot mutasyon oluşturulanlarda ise embriyo gastrülasyon safhasından önce kaybedilmiştir. APC'nin K14 formunun kaybı, embriyonik hücrelerde anormal morfogenezise sebep olmaktadır ki cilt dokusunda çeşitli appendikslere, saç

folliküllerinin, diş ve timusun gelişim organogenezisinde anormallikler görülmektedir. Yapılan bu çalışma göstermiştir ki APC geni epitelyal-mezenkimal gelişimi, hücre ve organogenezis sürecinde esansiyel bir gendir (46). APC geninde genetik ve epigenetik mekanizmalarla oluşan fonksiyon kaybı çeşitli tümöral oluşumlarda, karsinomaların büyük çoğunluğunda ve de sarkomaların küçük bir kısmında gösterilmiştir (47). APC genindeki somatik mutasyonların Familyal Polipozis Coli (FAP)'deki ekstrakolonik tümörlerin oluşumundan sorumlu olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. FAP'li hastalar APC geni için heterozigot mutasyon taşırlar ki bu hastalarda multiple kolorektal adenomalar APC geninde ki sağlam olan allelde ikinci bir mutasyon meydana gelince gelişir (45). APC geninin yabani tip(wild) allelinde meydana gelen ikinci bir somatik mutasyonla, Familyal Polipozis Coli(FAP) taşıyıcı hastalarda, genç yaşta çok sayıda kolorektal adenomaların gelişimine sebep olacaktır (26, 48).

E-kadherin:

Hücre membranlarından ekstraselüler matrikse uzanan 120 kD büyüklüğünde bir glikoprotein olan adhezyon faktörü molekülü olarak bilinen E-kadherin geni 16q22.1'de lokalizedir ve bu bölgedeki homozigot kayıpları çeşitli tümörlerde tanımlanmıştır. Normal epitelyum bütünlüğünün korunmasında ve devamında önemli görevleri vardır. Kadherinler stoplazmadaki kateninler ile birleşirler ve zonula adherensi oluştururlar ki bunlar da hücrede tutunma yeri ve stabilizasyonu sağlarlar. E-kadherin ekspresyonu azalınca tümörün invaziv özelliği ve tümörün lenfojen, hematojen metastaz özelliği artar. E-kadherinin kanser patogenezinde ve prognozun saptanmasında önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (49). Dorudi ve arkadaşları tarafından 1993'te 72 kolorektal karsinomlu hastada yaptıkları çalışmada E-kadherin gen ekspresyonunun immünohistokimyasal boyalarla belirgin olarak azaldığını bulmuşlardır (49). Schuhmacher ve arkadaşları ise 1998 yılında 29 kolorektal kanserli hastada yaptıkları çalışmada ise genin ekspresyonunun azalmasının invazyon ve metastaz ile ilgili olduğunu bulmuşlardır (50).

Beta Katenin :

Adenomatosis Polipozis Coli geninin Beta katenini bağlaması ilk kez 1993 yılında keşfedilmiştir (51). Beta-katenin 92-97 kDa ağırlığında bir proteindir. Başlıca iki rolü vardır: Birincisi hücreler arası yüzey adhezyon molekülü olarak diğeri de nükleusta transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. Stoplazmik domain olan E-kadherinle beraber aktine tutunarak hücre iskelet olarak da görev yapar. Lenfoid T cell transkripsiyon faktörünü aktive ederek Wnt sinyal yolağı regülasyonunda rol alır. β -katenin/Tcf faktörü **c-jun, c-myc, fibronectin, cyclin D1 and fra-1** genlerinin aktivasyonundan sorumludur (52,53,54).

Bu proteinin 130 aminoasitlik amino terminal ucu, merkezde 42 amino asit tekrarından oluşan 12 tekrar bölgesi ve de 100 amino asitlik karboksi terminal ucu vardır. Bu proteinin amino ucu çok sayıda fosforilasyona uğrayarak beta kateninin fonksiyonunun inhibe edilmesinden (down regülasyonundan) sorumludur. Bu bölgede meydana gelen mutasyonlar ve delesyonlar β -katenin proteininin sürekli çalışmasına sebep olur. Karboksil ucu ise transkripsiyonel olarak aktif olan bölgedir. Tekrar bölgeleri ise APC geninin bağlandığı bölgedir.

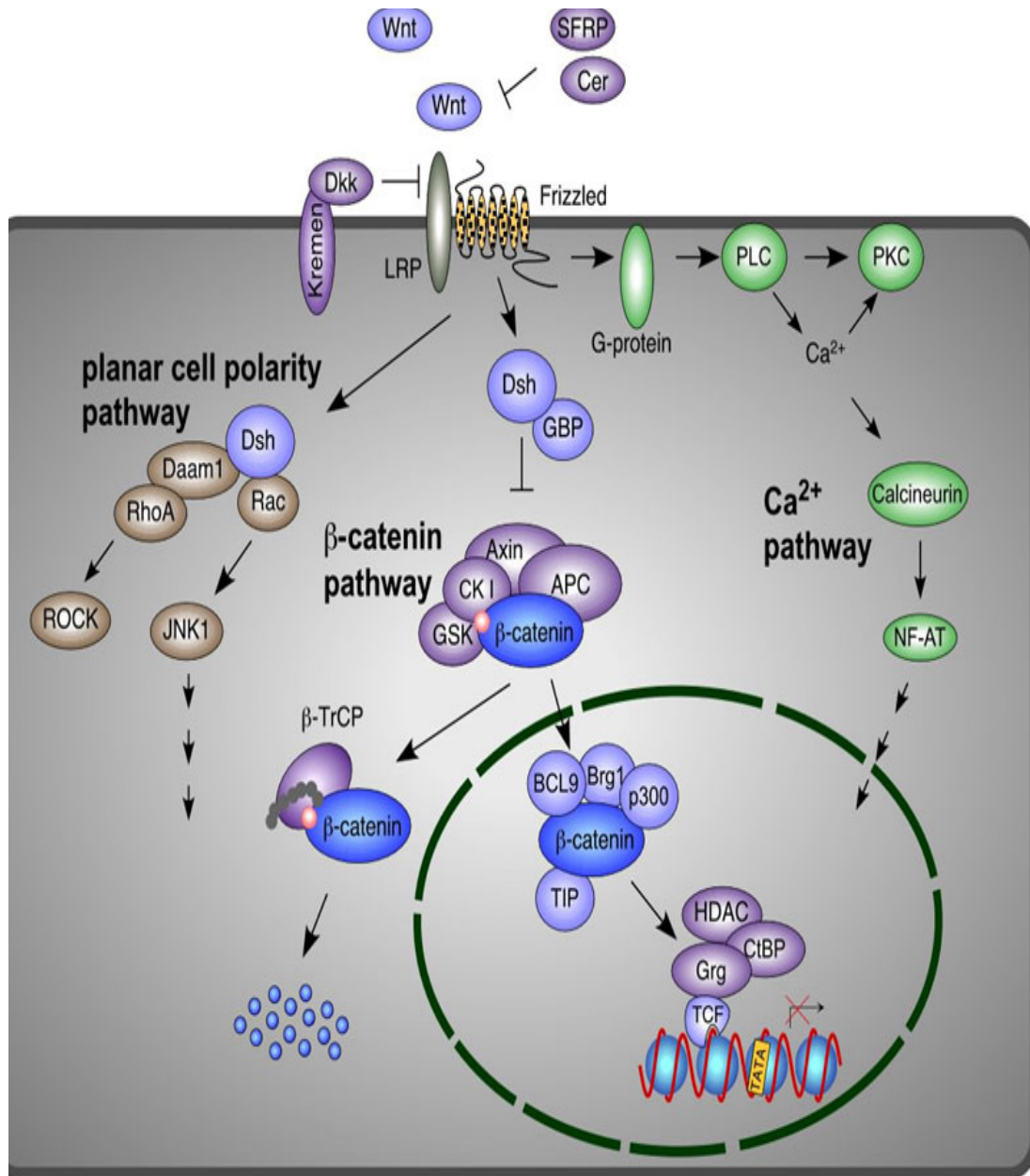
Beta Katenin yolağı:

Beta katenin, Wnt/Wingless (Wg) sinyal yolunda esansiyeldir ki gelişimsel süreçte segment polaritesi, axis spesifikasyonu, mezoderm ve memeli tümörlerinin meydana gelmesinden sorumludur. Şayet, Wnt sinyal yolağı aktive olursa, Beta-katenin /Arm proteini stoplazmada artar ve nükleusa girerek Tcfs artışına sebep olur. Böylelikle de Beta-katenin /Tcf etkisiyle c-myc geni ve cyclin D1 aktive olur. Tüm bu proteinler hücre proliferasyonu için esansiyeldir ve kolorektal kanserlerde aşırı aktif olarak çalışmaktadırlar(18).

Beta katenin yolunun regülasyonu iki şekilde gerçekleşmektedir:

1-Wnt sinyal yolağı yokluğunda: Wnt(Wg) yokluğunda Glukojen Sentetaz Kinaz 3 (GSK3), β -katenini fosforile eder. Bu mekanizmada APC geni, GSK3 ile APC/GSK3 kompleksini oluşturarak beta-katenini hedefler ve onu degrade ederek çökertir. Bu yolda Ubiquitin aracılık ettiği için yolun adı Ubiquitin Proteasome yoludur. Böylelikle Tcf faktörü de serbest kalarak DNA'ya bağlanır ve gen ekspresyonu ifade bulması inhibe olarak hücre siklusu inhibisyona uğratılır.

2-Wnt Sinyal yolağı varlığında: Wnt varlığında bilinmeyen bir mekanizma ile GSK3 inaktive edilir. Beta-katenin fosforilasyonu düşer ve Ubiquitin- proteasome yolu yıkılır. Böylelikle beta-kateninin stoplazmadaki konsantrasyonu artar ve nükleusa girerek bilinmeyen bir yol ile Tcf ile etkileşir ve engelleyici genlerin baskısı kalkar ve transkripsiyonel aktivasyon artırılır (55,56, 57).



Şekil 5- Wnt (Wingless) Sinyal İletim Mekanizması:

(Ca pathway: Kalsiyum yolu, β -catenin pathway: Beta katenin yolu, planar cell polarity pathway: düzlemsel hücre polarite yolu)

Deleted Colorectal Carcinoma (DCC) geni:

Fearon ve arkadaşları tarafından 18. kromozomun uzun koluna lokalize bir transmembran proteini olan ve yapısal olarak hücre adezyon molekülleri ile yakın benzerlik gösteren DCC (Deleted in colon carcinoma) geni tanımlanmıştır (58).

DCC geni, nöral adezyon ailesine bağlı bir tümör süpressör genidir. 18 nolu kromozom üzerinde yer alır. DCC genini hücre-hücre adezyonunu ve hücre matriks ilişkisini düzenler (59). DCC kaybının APC ve Ki-ras mutasyonundan sonra oluştuğu düşünülmektedir. DCC mutasyonlarının saptanması ve ifade kaybı kötü prognoz işaretidir ve Ki-ras geni ile beraber önlenebilir prognostik faktör olarak bilinmektedir (60,61,62). Epigenetik olarak DCC geninin promoter bölgesinin hipermetilasyonu baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomunda gösterilmiştir (63). Karaciğer metastazı olan hastaların çoğunda ise DCC kaybı olması bir metastaz supresör gen olarak tanımlanmasına yol açmıştır (64). Tıpkı p21(WAF/ CIP 1) geninde olduğu gibi.

p21(WAF1/CIP 1) geninin ifade kaybı kolorektal karsinomalı hastaların venöz invazyonu, lenf nodu metastazı ve karaciğer metastazında gösterilmiştir (65).

Kolorektal Adenokarsinoma Oluşumundan Sorumlu Olan

Proto- Onkogenler:

Tümör gelişiminde potansiyel fonksiyona sahip orijinal hücrel genler proto-onkogenler (c-onc) olarak adlandırılır. Bu genler normal ökaryotik hücrelerde var olan c-onc genleri olup ve normal hücre proliferasyonunu kontrol eden sinyal iletim yollarında fonksiyon yapan proteinleri kodlamaktadırlar (örneğin; src, ras ve raf). Proto-onkogen, onkogenin aktif olmadığı durumdur. Aktivasyon bakımından dönüşümlüdür. Çeşitli sebepler (virüs, radyasyon, translokasyon vb.) bu genlerin aktifleşerek bazı onkogen ürünlerinin sentezlenmesine ve hücreleri onkogeneze götürmesine neden olurlar (66,67). Bu proteinler : büyüme faktörleri ve/veya büyüme faktörleri için reseptörler, Ki-ras, c-myc ve siklinler ile fosfatazlardır. Büyümeyi stimule eden ajanlar arasında Ki-ras sıklıkla gastrointestinal sistem kanser ve displazi gelişiminde yer almaktadır (37,38). Ki-ras mutasyonları kolon kanserinin stage II fazında prognostik bir faktör olmaktadır. Beraberinde P53 mutasyonu ile beraber stage III'de kansere bağlı

ölüm oranının yükselmesine sebep olmaktadır (17,68) . Beraberinde DCC mutasyonu da varsa prognoz çok daha kötü olmaktadır (17) .

Ras proteinleri düşük molekül ağırlıklı GTPaz'lardır. Plazma membranında GDP'ye bağlanınca inaktif, GTP'ye bağlanınca aktif olurlar (69). Ras proteinleri insan kanserlerinde en fazla araştırılan mutant onkogenlerdir. Bu protein, hücre büyümesinde promotör etkiye sahip olup yoğun ve uygunsuz sinyal iletimine neden olur.

İnsanda üç tip ras geni tayin edilmiştir;

1- H-ras geni: Harvey murine sarkoma virüsünün onkogenine homologtur.

2- Ki-ras geni: Kirsteine murine sarkoma virüsünün onkogenine homologtur.

3- N-ras geni: Nöroblastoma hücrelerinden ilk olarak izole edilmiştir ve bir retroviral homoloğu yoktur (70).

P16: Genetik değişikliklerle meydana gelen 9 numaralı kromozomda yer alan CDKN2A inaktivasyonuna sıklıkla çeşitli kanserlerde rastlamaktayız (73). Bu bölgede hücre proliferasyonunun regülasyonunda ve genomik kontrol noktasında önemli rolü olan iki protein tanımlanmıştır (71). P16 INK4A proteini, exon E1 α , E2 ve E3 tarafından kodlanır. Hücre siklus regülatörüdür ki cyclin-dependent kinase aktivitesini sınırlar ve hücrenin S fazına girmesini inhibe eder. Diğer protein ise p14^{ARF1} proteindir. Exon E1 β , E2, ve E3 tarafından kodlanır ki hücre proliferasyonunda p53 aktivitesine, p53 inhibitörlerini MDM2 'yi bloke ederek destek olur. Kanser hücrelerinde kolon kanserinde olduğu gibi CDKN2A inaktivasyon mekanizmaları olan delesyon, mutasyon ve promotör hipermetilasyonu çeşitli yayınlarda gösterilmiştir (71). Kolon karsinomunda CpG adalarının 5 metil sitozin oranı % 1-10 arasında olduğu, metilasyonun normal kolonik mukozada otozomal olarak kalıtıldığı bildirilmiştir (72).

Kalıtsal Kolon Kanseri ve DNA Tamir Bozuklukları

Kolon kanserine genetik yatkınlığın iki formu bilinmektedir. Kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser (Herediter Nonpolipozis Colorectal Cancer; HNPCC) olarak bilinen genetik kompleks form, diğeri ailesel adenomatoz polipozis (Familial Adenomatosis Polipozis; FAP) olarak bilinen otozomal dominant formdur. Herediter Non Polipozis Colorectal Cancer (HNPCC) DNA tamir yolundaki bozuk bir genin sebep olduğu kansere iyi bir örnektir. MSH2 ve MLH1 genlerinde mutasyon, delesyon ve alievi kalıtımla gelen mutant durum bu kanser tipinde tanımlanmıştır.

MLH1 geni kolonik, gastrik ve endometrial kanser oluşumundan sorumludur. Bu gen kromozom 3p lokusunda yer alır ve DNA tamir bozukluğu (mismatch repair) mekanizmasında rol alan bir proteini kodlar (74). MLH1 geni germlin mutasyonuna HNPCC'de yüksek oranda rastlanılmıştır. Sporadik kolon kanserlerinin %15-25'inden sorumludur. Bu kanserler yüksek oranda mikrosatellit instabilitesi gösterirler. HNPCC'de ikinci germline mutasyon gösteren gen hMSH2'dir ki bu genin mikrosatellit instabilitesi (MIN) göstermesi nadirdir. hMLH1'in promoter hipermetilasyonu ile epigenetik olarak inaktivasyonu kolon kanserlerinde ve diğer genel epitelyal kanserlerde; endometrial ve gastrik kanserlerde gösterilmiştir. MLH1'in promoter hipermetilasyonu ile olan ilişkisi, MSH2'den daha güçlü olarak bildirilmiştir (74). Mismatch repair sistemi yani hatalı dizinin tanınıp yok edildiği sistemin aktivasyonu hücre proliferasyonunun arttığı durumlarda artmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu tamir sisteminin çalışmadığı durumlarda normal hücrelerde de MLH1 geninin mutasyona uğradığı tespit edilmiştir (75). Kolorektal karsinomalarda MLH1'in metilasyonla inaktivasyonu ve genin ekspresyon kaybı birlikte gösterilirken, normal dokuda ve kanser dokusunda genin ekspresyonu normal ise metile olmadığı gösterilmiştir (76). Genin ifadesi yeniden 5-AZA-CdR tedavisi ile kazanılmaktadır(77, 78). Familial Adenomatöz Polipozis Coli'de ise APC geninde mutasyon gösterilmiştir (48,26).

Tablo 1: Kolorektal karsinom sendromları

| Sendrom | İlgili Gen | Bulgular |
|------------|------------------|---|
| FAP | APC gen 5 q | Polipozis zemininde Mültisentrik HPCC |
| Lynch I | H MH 2 gen -2 p | HNPCC Sağ kolon yassı adenomlar Senkron ve metakron CRC |
| Lynch II | H MLH 1 gen -3 p | Sağ kolonda CRC Over, uterus Üretelyal epit. Ca |
| Torre-Muir | H-ras 1 mutasyon | Mülipl CRC Sebaseöz adenoma Keratoakantoma. |

Kolorektal Mukoza Karsinogenezi Özetleyecek Olursak

Kolon ve rektum mukozasında adenomadan karsinoma gelişimi uzun süren bir yoldur (19). Bu süre 10-35 yıl arasında ki bir zaman diliminde gerçekleşmektedir. Tümör klinik semptom vererek teşhis edildiğinde, hastalarda genellikle altıncı yaş dekadına (ortalama 55 yaşına) ulaşmış olurlar. Genetik ve somatik mutasyonlar sonucu çift allel kaybıyla inaktivasyona uğrayan tümör supresör gen kontrollerinin kalkması, aktive olan onkogenik etki, hatalı DNA replikasyon ürünü olan kök hücre ve/veya hücrelerinin klonal ekspansiyonunu başlatır. Bunu iltihabi barsak hastalıklarında adenomatöz hiperplazi ve displazik değişimle birlikte görebiliriz. Bu süreç sırasındaki genetik alterasyonlar ise, bilindiği gibi kolorektal kanserlerin %75'inde saptanan p53 tümör supresör gen inaktivasyonuna neden olan mutasyon ya da delesyonlar ile %50 oranında Ki-ras proto-onkogen spesifik aktive edici mutasyonlardır. Daha az oranda myc, myb ve neu-proto-onkogen aktivasyonları da saptanmaktadır. Ayrıca APC(adenomatöz polyposis coli) geni 5q'da, DCC (deleted in colorectal carcinoma) geni 18q'da, MCC (mutated in colorectal carcinoma) geni 5q'de inaktivasyona uğrarlar. Onkogen aktivasyonları, kolon kanserlerinde yüksek oranda 12 p'de Ki-ras ve daha az oranda 1 p'de n-ras ve 8p'de c-myc şeklinde sıralanır. Onkogen aktivasyonları ile tümör süreci başlamış olur (79).

GENOMİK İNSTABİLİTE

1-SİTOGENETİK BULGULAR (Kanser ve Sitogenetik İlişkisi):

Tarihsel gelişim sürecinde kanser ve sitogenetik ilişkisi ilk defa Philedelphia (Ph) kromozomunun bulunması ile kronik myeloid lösemi (KML)'de konulmuştur. Philedelphia (Ph) kromozomu kök hücrelerde kazanılmış somatik mutasyonu göstermesi bakımından çok önemlidir (81). Daha sonra yapılan çalışmalarda kromozomal aberasyonların benign ya da malign tümörlere eşlik ettiği gösterilmiştir (82,83,84). Bu çalışmaların öncülüğünde kanserde görülen sitogenetik bulgular üç sınıfta toplanmışlardır (85).

1-Tümöre özgü olan onkogenezen sorumlu olduğu düşünülen soliter ve birincil(primer) değişiklikler

2-Tümörün son evrelerinde görülen, ilk evreye ek olarak ortaya çıkan, asla soliter olmayan sekonder değişiklikler, birincisi kadar özgül olmasa da tümöre özgüdür ve de progresyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (86).

3-Gürültü olarak adlandırılan daha çok genetik kararsızlıkla alakalı olduğu düşünülen değişikliklerdir. Özgül değildir. Tümör progresyonu ve gelişimindeki rolü tam olarak bilinmemektedir.

Kanser oluşumdan ve progresyonundan sorumlu kazanılmış kromozom anomalileri mikroskopik düzeyde:

- a) Translokasyonlar (dengeli ve dengesiz) , kromozomlar arası karşılıklı parça değişimi
- b) Delesyonlar (terminal ya da intersitiasial), bir kromozom segmentinin yitilmesi
- c) İnversonlar (perisentrik veya parasentrik), bir kromozom bölgesinin sentromeri kapsayacak şekilde veya sentromerin dışında, kendi içinde ters dönmesi
- d) Anöploidi, bir veya daha fazla sayıda kromozomun sayısal olarak artması ya da eksilmesi (monozomi, trizomi, tetrazomi vs) şeklinde gözlenmektedir.

Ayrıca double minute olarak adlandırılan asentrik küçük kromozomlar, intrakromozomal anormal bandlanma bölgeleri (abr) bulunmaktadır. Bu bölgelerin anormal gen amplifikasyonu sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (87,88).

Kanserde yapılan çalışmalarda ortaya çıkan bulguların rastgele olmadığının görülmesi kanser sitogenetiği üzerine yapılan çalışmaların önemini artırmaktadır. Belli tümör tiplerine özgü olarak aynı kromozomal kırılma noktalarının ve yeniden düzenlenmelerin olması önemlidir (89). Ayrıca, karyotipik değişikliklerin neoplazi türlerine göre özgül olarak gözlenmesi, kanserde sitogenetik çalışmalara tanısal bir değer kazandırmaktadır.

Kanserin ileri evrelerinde daha fazla agresivite kazanmalarında kanser hücrelerinin öncü hücrelere geri dönüşüm göstermelerinin önemi büyüktür. Geri dönüşüm basamaklarının olabileceği hipotezi 1957'li yıllara dayanmaktadır (90). Tümörler üzerinde yürütülen kromozom çalışmaları, tümörün klinik ve biyolojik davranışları ile yeni karakteristikler taşıyan hücresel alt populasyonların ortaya çıkmasının, kısmen de olsa dizinsel ikincil genetik değişikliklerin bir yansıması sonucunda oluşabileceğini göstermiştir. İkincil anomaliler olarak görülen 1 nolu kromozom yapısal anomalileri; retinoblastom, willms tümörü, kolorektal karsinom, over adenokarsinomu, uterine adenokarsinomu, meme adenokarsinomu ve mesane adenokarsinomu gibi çeşitli tümörlerin progresyonu ve metastatik kapasitelerindeki artış ile ilişkili olarak rapor edilmiştir (91).

Kolorektal karsinomada epitelyumdan karsinomaya geçiş süreci basamaklar olarak izlendiği için , kolorektal karsinomadaki sitogenetik değişiklikler gösterilebilmiştir (95). Kolorektal kanserlerin %25-50'sinde 21q, 4p, 6p, 8p, 9q, ve 22q'de allelik delesyonlar bulunmaktadır (67). Wang ve arkadaşları, 18 kolorektal karsinomalı hastanın tümör dokularında yaptıkları sitogenetik çalışmada kromozom 5q delesyonunu ve t(13;17)(q;p)'yi saptamışlardır (92,93,94). Kolon kanserinde anöploidi evre III' de görülen bir bulgudur kötü prognoz göstergesidir (17).

2- MİKRONÜKLEUS

Mikronükleus test yöntemi ilk defa 1970'lerin ortalarında tanıtılmıştır (95). Mikronükleus, hücre sitoplazması içinde ana nükleusların dışında fakat onunla aynı şekil, yapı ve boyanma özellikleri gösteren küçük küresel yapılar olarak tanımlanmaktadır. Radyasyon veya kimyasal mutajenlerle hasar görek bölünme sonrasında yeni oluşan çekirdeklere dahil olmayan tüm kromozom veya kromozom parçaları sitoplazmada yoğunlaşarak mikronükleusları meydana getirirler.

Mikronükleus (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan tam kromozom veya akrosentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır (96). Mikronükleus sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar sentromer bölünme hatalarına ve iğiplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak, klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak mikronükleus oluşuma katkıda bulunmaktadırlar.

Mikronükleus analizi uluslararası düzeyde kabul edilen ve biyolojik sistemlerde genomik instabilitenin saptanmasında kullanılan önemli bir ex vivo mekanizmadır. Diğer yandan mikronükleus analizi bir ajanın (genotoksik, sitotoksik yada karsinojenik) ökaryotik bir hücrede neden olduğu DNA hasarı mutasyonlar ve diğer hücrenin patojenitesine katkı yapabileceği olan parametrenin saptanmasında kabul edilen en geçerli mutasyon analiz tekniğidir (97,98).

EPIGENETİK

Epigenetik terimi ilk kez 1942 yılında Conrad Waddington tarafından genler arası etkileşimde çevresel faktörlerin fenotipte kendini göstermesi olarak kullanılmıştır(99).

*Gen ekspresyonuna dayanan kalıtsal bilgi epigenetik olarak sınıflandırılır. Bu, genetik bilginin aksine gen dizisi ile ilişkili değildir.

*Başka bir deyişle, gen fonksiyonlarında meydana gelen mitotik ve/veya mayotik, kalıtsal değişimlerdir ve DNA dizisinde meydana gelen değişimlerle açıklanamazlar.

*Epigenetik, genotipte herhangi bir değişiklik olmaksızın fenotipi etkileyen bütün faktörler, bunların fenotipte meydana getirdikleri değişikliklerin tümü ve etki mekanizmalarını inceleyen genetik alt dalıdır.

*Yetişkin dönem kalıtımı ya da somatik hücre kalıtımı olarak da tanımlanabilir (100,101).

Hücreler gen ifade kontrolünü nükleozomları kullanarak yaparlar. Nükleozomlar, DNA'nın globüler histon proteinleri etrafında sarılarak oluşturdukları eskiden kromomer olarak bilinen yapılardır. Nükleozomlar kromatin denilen yapıyı oluştururlar. Kromatin yapısındaki değişiklikler gen ifadesini kontrol eder (102). Kromatinin sıkılaşıp yoğunlaştığı hali inaktif iken (heterokromatin), gevşek hali (eukromatin) ise aktiftir (69, 103). Kromatinin yapısındaki bu dinamik durum ise geri dönüştürülebilir olan ve DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonları ile sağlanan epigenetik patternler ile değiştirilir. Bu işlemlerde görevli olan enzimler arasında DNA metiltransferazlar (DNMT), histon deasetilazlar (HDAC), histon asetilazlar, histon metil transferazlar ve metil binding protein MECP2 sayılabilir (45). Epigenetik değişimler genlerin sessizleşmesine (silencing) neden olurlar. Bu da geni inaktive edici bir mutasyon veya delesyon gibi genetik bir mekanizmayla eşdeğerdir. Ancak epigenetik değişimler geri dönüşümlü oluşları ve DNA'nın baz dizisinde bir değişime neden olmamaları gibi özellikleriyle genetik değişimlerden ayrılırlar.

Epigenetik Mekanizmalarla Sessizleştirilen Genler

Tümörlerde genler sıklıkla metilasyon tarafından sessizleştirilirler:

Hücre siklusunda etkili olan genler; RB1, p16INK 4a, p15INK4b (lösemi), p14 ARF (kolon,mide),

Sinyal iletiminde etkili olan genler; APC, LKB1/STK11, RASSF1,

Apoptosiste etkili olan genler; DAPK (lenfoma), caspase-8

DNA tamirinde etkili olan genler; MGMT (beyin, akciğer, kolon ca. , lenfoma), BRCA1 (meme,over ca.), MLH1 (kolon, mide, endometriyum ca.),

Karsinojen metabolizmasında etkili olan genler; GSTP1 (meme,karaciğer, böbrek, prostat ca.)

Hormonal cevapda etkili olan genler; ER, PR RAR (kolon,akciğer, meme, lenfoma)

Metastazda etkili olan genler; E-cadherin, VHL olarak sınıflandırılabilir (104, 105, 106, 107).

Epigenetik Mekanizmalar

Transkripsiyonel

A-Histon modifikasyonları

B-DNA metilasyonu

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu birlikte, epigenetik regülasyonda genomik imprinting, X inaktivasyonu ve genomun yeniden programlanmasında görev alırlar (102).

Post - transkripsiyonel

A-RNAi

Bu mekanizmalar esas olarak transkripsiyon regülatörlerinin DNA'ya ulaşabilirliğini etkilerler.

Fosforilasyon, ubiquitinasyon, yüksek mobiliteye sahip non-histon proteinlerin varlığı ve asetilasyon ise nükleoproteinler düzeyinde (histon - nonhiston) yapılan epigenetik modifikasyon mekanizmaları olup gen ekspresyonu farklılaşmasında rol alan en önemli mekanizmalardır (69).

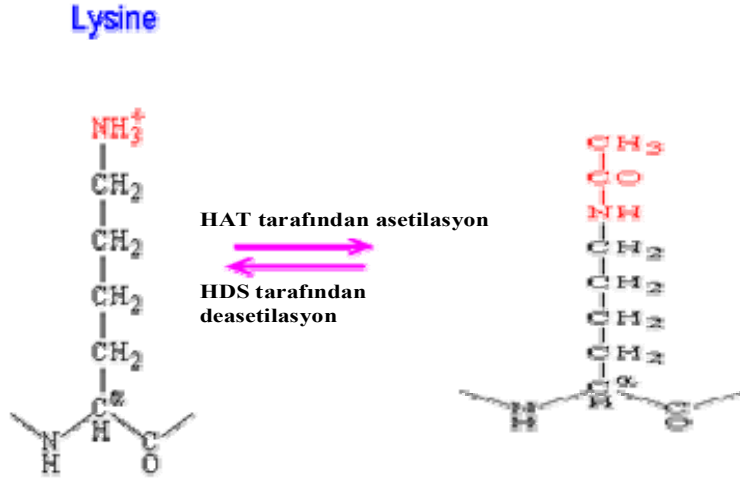
1. Transkripsiyonel mekanizmalar

A. Histon Modifikasyonları

- 1.Histon asetilasyonu / deasetilasyonu
- 2.Histon metilasyonu
- 3.Serin veya treoninlerin fosforilasyonu
- 4.Glutamik asitlerin ADP-ribozilasyonu
- 5.Histon ubiquitinasyonu

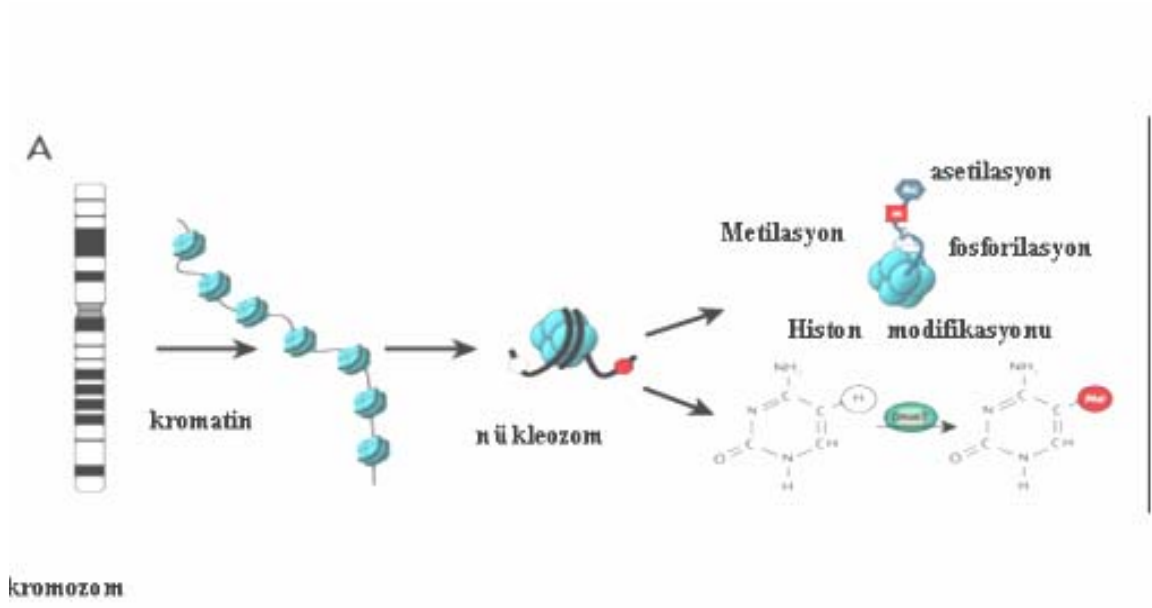
Tüm bu mekanizmalar (69,103), kromatin yapısında değişiklikler oluşturarak transkripsiyonu düzenleyici komplekslerin DNA'ya ulaşabilirliğini etkilerler. Ayrıca birçok histon modifikasyonu geri dönüşümlüdür ve modifikasyon seviyesi ile transkripsiyon seviyesi sıkı ilişki içerisindedir.

Histon proteinleri DNA'nın paketlenmesinde görev alırken, nükleozomdan dışarıya çıkıntı yapan bazik NH₂ (amino) terminal uçları bir takım post-translasyonel modifikasyonlara uğrayabilir. Bu modifikasyonlar arasında; HAT (histon asetil transferaz)'lar tarafından asetillenme ve HMT (histon metil transferaz)'lar tarafından metillenme yer almaktadır.

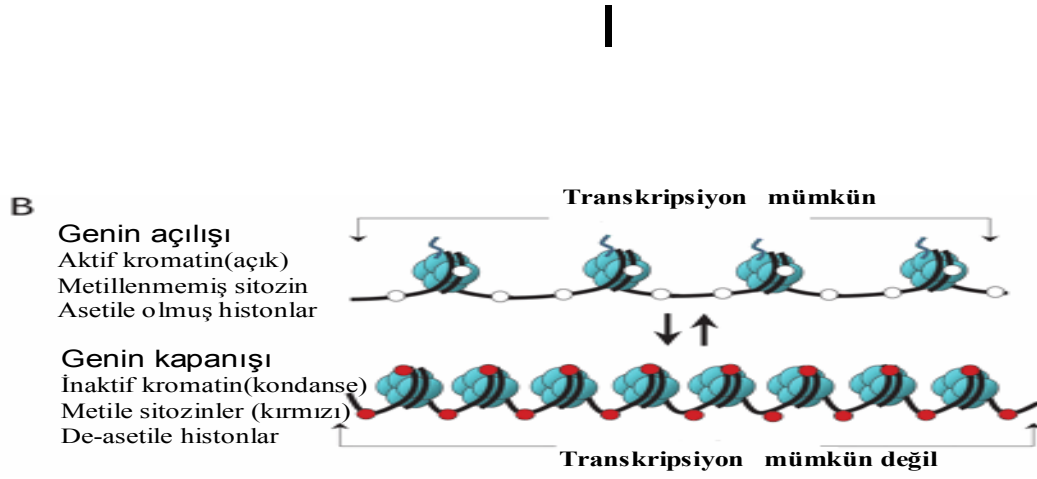


Şekil 7- Histon proteinlerinin asetilasyon ve de-asetilasyonu

Bu enzimler aracılığı ile kromatinin yapısı değiştirilirken gen regülasyonunda önemli rol oynarlar. Asetilasyon ile histondaki pozitif yük (+) nötralize edilirken histonun DNA'ya olan elektrostatik etkileşimi zayıflatılır. Histon modifikasyonları (69,108) kromatinin ökromatik ya da heterokromatik durumu gözetilerek gen aktivitesi ya da inaktivitesinde marker olarak kullanılabilir. H3 ve H4 histon lizin rezidülerinin asetilasyonu (109), aktif gen çalışması yani ökromatik durumla gösterilebilirken, deasetilasyon ise kromatinin daha sıkı paketlendiği heterokromatik durum ile izah edilebilir. Histon lizin metilasyonu ise, asetilasyonun tersine, hangi rezidüde olduğuna göre aktivasyon ya da inaktivasyonla sonuçlanabilir. Bu yolla, histonlardaki spesifik modifikasyonlar, transkripsiyonel olarak aktif ve inaktif kromatinin belirlenmesinde bir çeşit “marker” olarak kullanılabilir. Histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ile birlikte çalışarak gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol alırlar (103,110).



Şekil 8A- Kromozom, kromatin, nükleozom metilasyon ve histon modifikasyonu ilişkisi
(103)



Şekil 8-B : Histonların Spesifik Modifikasyonları ve Metilasyon ile transkripsiyonun iliştilişi (103).

B-DNA Metilasyonu:

DNA metilasyonu, DNA **metil- modifikasyon sistemi** olarak adlandırılır. DNA metil transferaz enzimi tarafından genel bir metil donörü olarak bilinen S-adenozil metioninden bir metil grubunun alınıp transfer edilmesi esasına dayanır (111, 112,113).

Memeli hücrelerinde modifiye sitozin (5-mC) % 90 oranında CpG dinükleotid yapısında bulunur ve **episitozin** olarak adlandırılır. Episitozin denilmesinin sebebi epigenetik kalıtımda rol almasındandır. Özellikle somatik hücrelerde gen işlevleri üzerinde önemli etkiye sahiptir (114). DNA metilasyon değişiklikleri genellikle CpG (Sitozin fosfo Guanin) dinükleotidlerinde meydana gelir. CpG dinükleotidleri genellikle hedef noktalarıdır ve 1-2 kb uzunluğundadır. CpG adaları olarak adlandırılır . Genin içinde ya da genin promoter bölgesi yakınında ve genlerin 1. exon bölgelerinde yer alırlar (115). CpG adalarının genomda görülme sıklığı %5-10 arasındadır (116). Memelilerde metilasyon semi-konservatif şekilde kalıtılır (117). DNA metilasyonu 1948 yılında Hotchkiss tarafından ilk olarak keşfedilen epigenetik markır olmuştur (118).

DNA metillenmesi/ metilasyonu ile gen ifadesinin düzenlenmesi

Birçok ökaryotik organizmanın DNA'sı metil gruplarının enzim aracılığı ile bazlara ve şekerlere eklenmesi yoluyla, replikasyondan sonra değiştirilir yani post sentetiktir modifikasyondur (119).

Bazların metillenmesi genellikle sitozinden olur ve belirli herhangi bir ökaryotik organizmanın sitozinlerinin yaklaşık %5'i metillenir. Ancak, metilasyon derecesi dokuya özgüdür ve % 2 'den % 7 'nin üzerine çıkacak şekilde değişiklik gösterir.

Baz metilasyonunun gen ifadesini değiştirdiğinin ortaya çıkarılması, E.coli'nin lac operonu ile yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Operatör bölgedeki DNA'daki tek bir sitozinin metillenmesi bile, resöptörün operatöre olan ilgisinde fark edilebilir bir değişiklik yaratabilir (14).

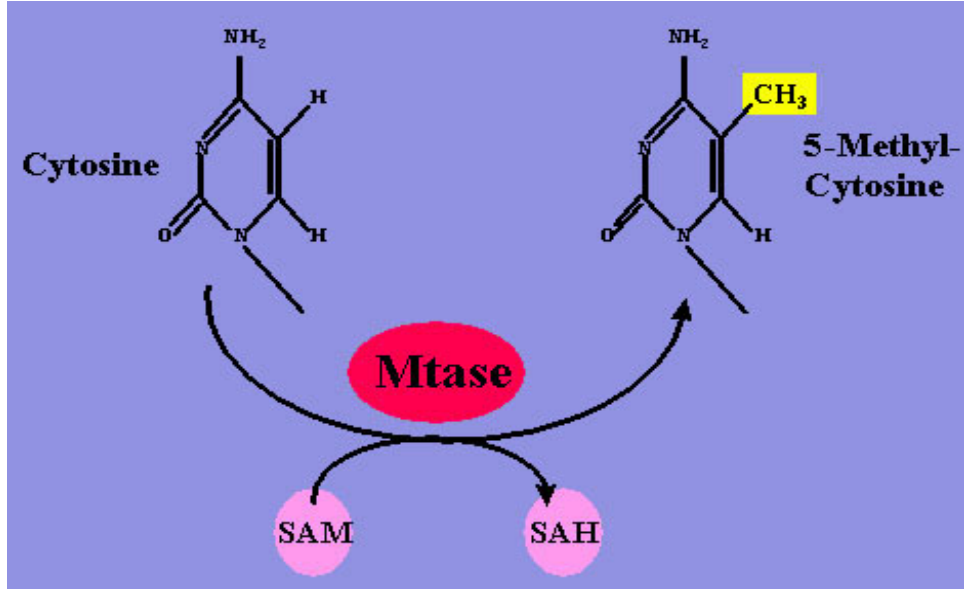
Sitozin 5' ucundan metillenir, böylece metil grubu DNA sarmalının büyük olduğundan dışarı çıkıntı yapar ve proteinlerin DNA'ya bağlanmasını etkiler. Metillenme, genellikle DNA 'daki CG çiftleri halinde bulunan sitozinlerden ve genellikle de her iki zincirde birden olur.

5'-----mCpG-----3'

3'-----GpCm-----5'

5-metil sitozin varlığı, bulunduğu kromozom bölgesinde lokalize olan genlerin sessizleşmesine yol açar (120). Hücrede pek çok mekanizmanın düzenlenmesinde replikasyon, transkripsiyon, DNA tamir, rekombinasyon ve gen transpozisyonunda görev alır (121).

S-adenosilmetiyonin (ado-Met), aktif metiyonin formu olup metilasyon reaksiyonlarında metil (-CH₃) vericisi olarak görev yapar (23, 113, 121, 122).



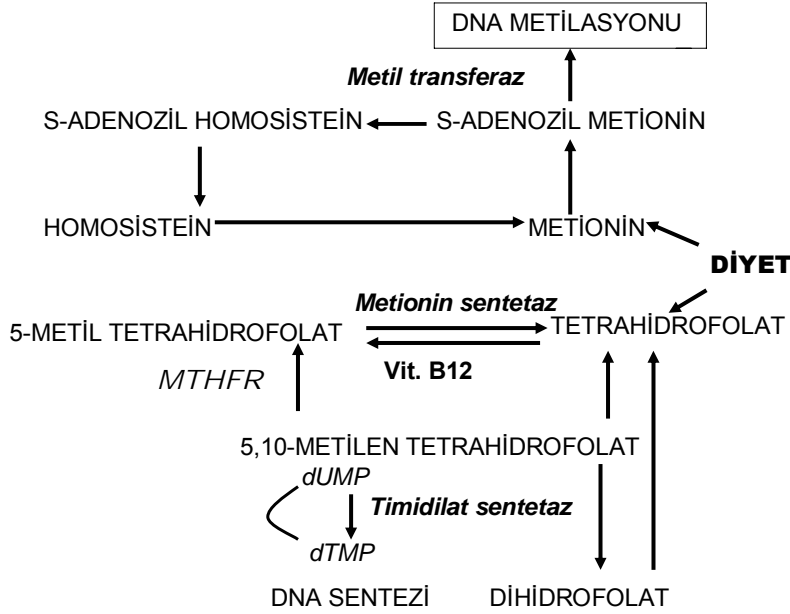
Şekil 9- Sitozinin 5-metil sitozine dönüşümü

Beslenmeyle sağladığımız ve vücut için esansiyel madde olan **folat**, DNA metilasyonunda aktif rolü olan S- Adenozil Metionin (SAM) sağlayıcısıdır. SAM evrensel metil donörüdür ki DNA sentezi ve tamir için gereklidir(123).

Folat, pürin ve timidin sentezinde, DNA metilasyonunda C1 grubunun transferinde rol almaktadır. Tüm retrospektif çalışmalarda ve prospektif epidemiyolojik çalışmalarda yüksek folat alımıyla kolorektal kanser oluşumunun azaldığı gösterilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki diyetle düşük metil donörlerinin alınması, folat ve metiyoninden fakir beslenme ve yüksek alkol alımlarının kolorektal kanser oluşum

riskini arttırmaktadır (124). Alkol, folik asit metabolizma antagonistidir. Folattan fakir beslenme ve beraberinde alkol alımı kolorektal kanser oluşma riskini 2.5 kat daha fazla yükseltmektedir (125).

MTHFR (metilen tetra hidro folat redüktaz) enzimi folat metabolizmasında anahtar rol alan bir enzimdir. Yapılan çalışmalarda Sitozinin Timine dönüştüğü transisyon 677(677T) polimorfizmi, folattan fakir beslenenlerde kolorektal neoplazi riskini artırmaktadır (126). Tüm kolorektal kanserlerde ve adenomatöz poliplerde yapılan çalışmalarda MTHFR genotipi homozigot mutasyonunda (düşük enzim aktivitesinde) folat ve folat metabolizmasında rol alan B12, B6 vitamininden fakir beslenme tarzında kanser riskinin arttığı gösterilmiştir (123,126). Folat suplement tedavisi 10 mg/gün ile rektal mukozada DNA metilasyonu düzeltilebilirken (127), DNA hasarı 5 mg/ gün folik asit ile azaltılabilmektedir(128).



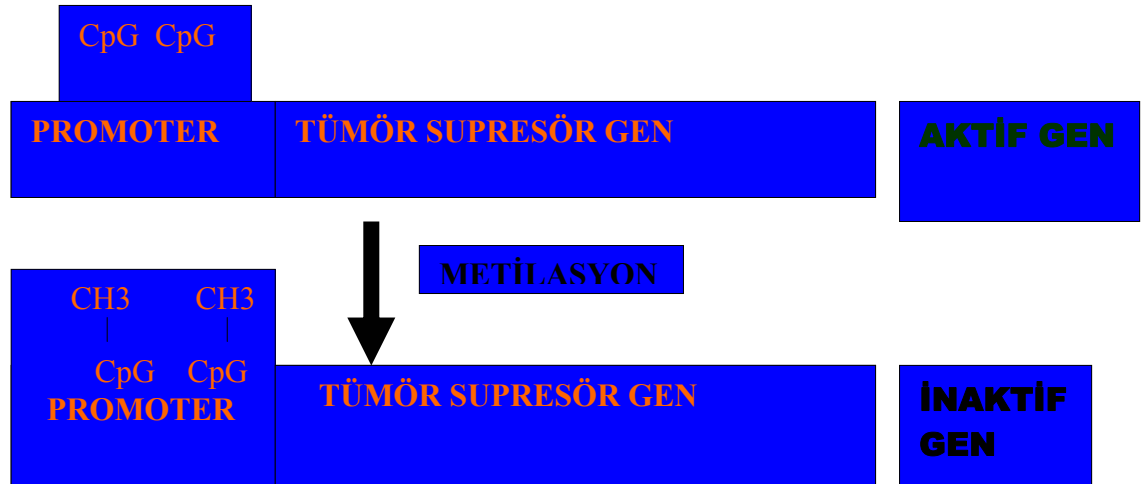
Şekil 10- MTHFR'ın DNA Metilsyonu ve DNA Sentezinde Folat Metabolizmasındaki Rolü (124)

İnsan kanserlerinde DNA metilasyon değişimlerinin 2 genel tipi gözlenmektedir:

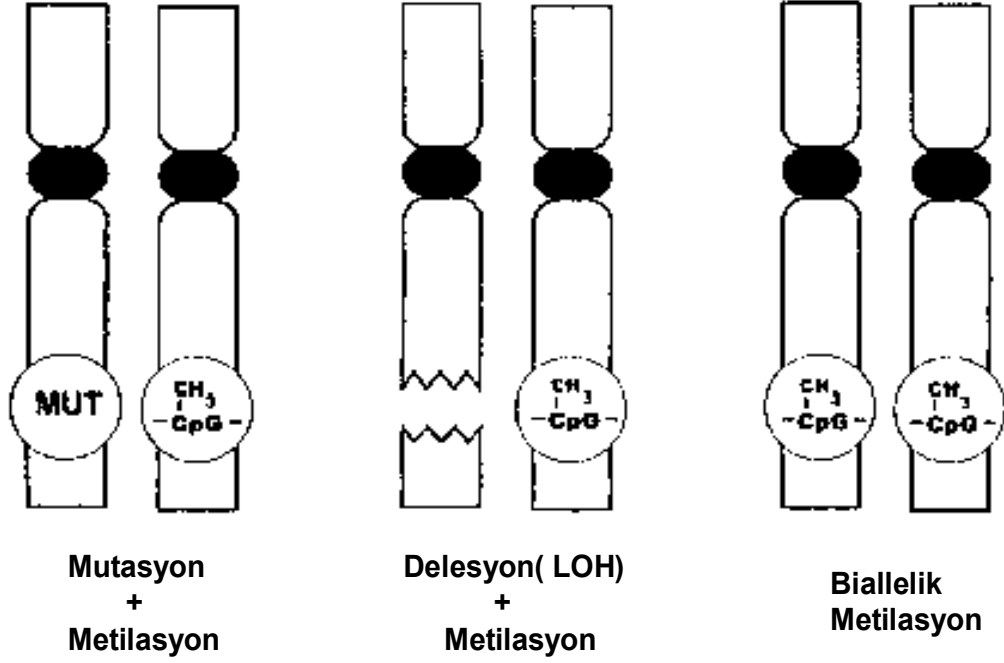
1. Genomik Hipermetilasyon
2. Genomik Hipometilasyon

1- Genomik Hipermetilasyon:

Genomik hipermetilasyon mekanizması başta tümör supresör genler olmak üzere genomda hayati fonksiyonu olan pek çok gen hipermetile hale getirilerek sessizleştirilir; DNA tamir genleri, hücre siklus regülatörleri, apoptozis ve detoksifikasyonla ilişkili genler gibi. Çok sayıda tümör supresör genin promoter hipermetilasyonu ile transkripsiyonu inhibe edilmektedir (129).



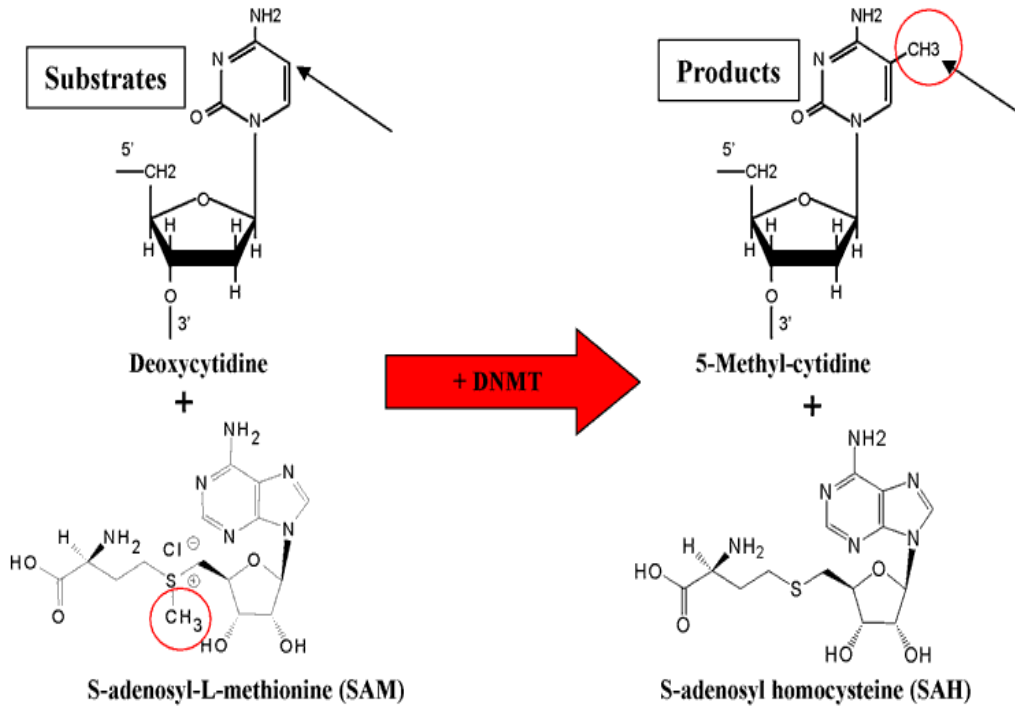
Şekil 11- Tümör supresör gen epigenetik olarak inaktive edilmesi (128)



Şekil 12-Tümör Supresör Gen İnaktivasyonu

Tümör supresör genlerinin inaktivasyonu yalnızca ürün model aberrant metilasyon yerleşimi ile ya da mutasyon ve delesyon. Biallelik gen inaktivasyonu sadece mutasyon ve/ veya delesyonla olmayabilir ve biallelik metilasyonla da olabilmektedir (128)

DNA METİL TRANSFERAZLAR (DNMT)



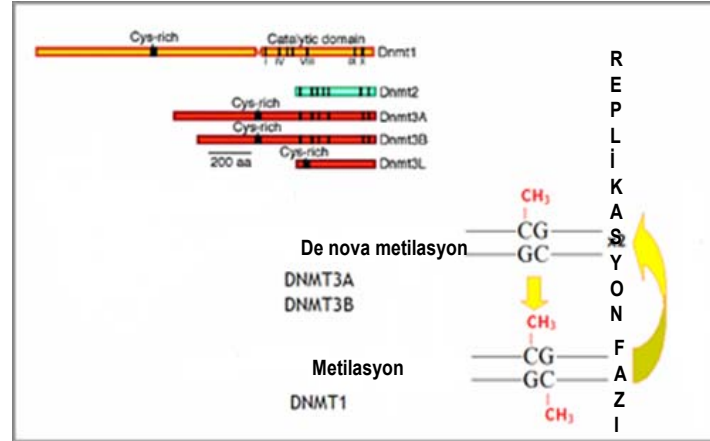
Şekil 13- DNA Metil Transferaz Aracılı Metilasyon

DNA Metiltransferazlar(MTazlar):

Bilinen 5 tip insan DNA metil transferaz enzimi vardır. Bunlar, DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L olarak adlandırılmıştır. Bunlardan, animo-terminal regülatör domeyni bulunmayan DNMT2 ve katalitik domeyni olmayan DNMT3L dışındakilerin hepsinde enzimatik aktivite görülmektedir (131).

1-DNMT 1: Başlıca etkin olan DNMTaz enzimi budur. Hemimetile DNA'dan semikonservatif DNA zincir sentezinde rol alır. Aktivasyonu histon deasetilaz enzimi ile düzenlenir. Somatik hücrelerde en fazla bulunan DNMT'dır.Yarı metillenmiş DNA'yı, metillenmemiş DNA'ya nazaran 10-20 kat daha fazla tercih eder (136).

2-DNMT3a, DNMT3b: Bu enzimlere denova metilazlar da denilmektedir. Unmetile CpG baz çiftine veya yarı metilenmiş(hemimetile) DNA'ya metil grubu bağlarlar. Yani hem metilenmiş DNA'yı hem de metillenmemiş DNA'yı kalıp olarak kullanırlar. Denova metilasyon, hücre büyümesi ve farklılaşmasında rol almaktadır. Hatta tümörögeneziste atipik metilasyondan sorumludur. DNMT2'nin diğer metiltransferazlar gibi, korunmuş olan metiltransferaz motifini taşıdığı gösterilmiştir ancak aktivitesi görülmemiştir. DNMT 3b ile ilgili mutasyon ICF (immunodeficiency in association with centromere instability of chromosome 1, 9, 16, and facial anomalies) hastalığının meydana gelmesinden sorumludur (132, 136).

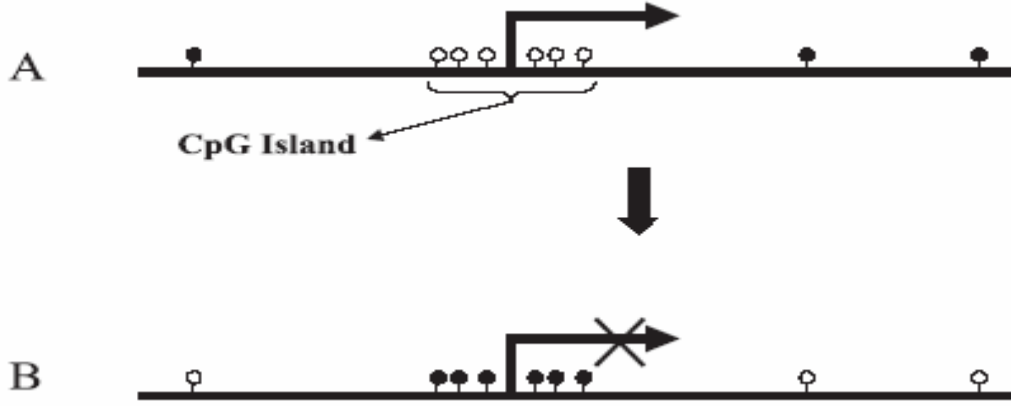


Şekil 14: DNMT'lar ve Etki Mekanizmaları (135)

Memelilerde metiltransferaz enzimi, hemimetile DNA'da CpG konumundaki sitozini metilleme yanı sıra gelişme döneminde de ametile DNA' da aynı konumdaki sitozini metillemektedir (133). Enzimler hemimetile DNA'yı substrat olarak kullanırlar. Metillenecek baz enzimin regülatör alt birimi tarafından tanınır, baz çifti sarmalın dışına doğru döndürülür ve katalik alt birim tarafından metil grubu transfer edilir(134).

Metil transferaz (MTaz) enzimleri prokaryotlarda hücre DNA'sının çeşitli restrüksiyon enzimlerine karşı korunması ve DNA replikasyonu sırasında yanlış eşleşmelerin (mismatch) giderilmesinde görev almaktadırlar (135).

Metil transferazlar ökaryotlarda hemimetile DNA'ya metil gruplarının transferinde rol alırken, kromatin paketlenmesi, kromatin organizasyonu, gen regülasyonu, genomik imprinting , transkripsiyonel kontrol, DNA tamiri, DNA replikasyonunun başlatılması, embriyonel dönemde gelişme ve doku farklılaşması, doku ve allel spesifik gen reaktivasyonu ve X kromozom inaktivasyonuna aracılık etmektedirler (137).



Şekil 15- CpG ada Metilasyonu: A- Hipometilasyon ile transkripsiyon pozitif B: Hipermetilasyon ile inaktif transkripsiyon(138)

DNA HİPOMETİLASYONU

Genom hipometilasyonu onkogen aktivasyonuna, kromozomal instabilitenin başlamasına sebep olur. DNA hipometilasyonu epigenetik ya da genetik mekanizma ile lenfomagenezise sebep olur.

Burada 3 tip mekanizma söz konusu olabilir (139).

1-Hipometilasyon ile endojen retroviral elementlerin indüklenerek, proto- onkogenlerin aktivasyonu ile onkogene dönüşmesi mümkündür. C-myc geni de sıklıkla retroviral elementler ile aktive edilir (122).

2-Hipometilasyon proto-onkogenleri epigenetik etkiyle aktive edebilir (129). Tüm hipometile tümörlerde c-myc genini aşırı eksprese olarak görmekteyiz.

3- Hipometilasyon genomik instabiliteyi indükleyebilir. Kolorektal tümör hücrelerinde (140), sıçan tümör modellerinde ve ICF (immün yetmezlik, sentromerik instabilite, fasial dismorfizm) sendromunda DNA metilasyon defekti genomik instabiliteye sebep

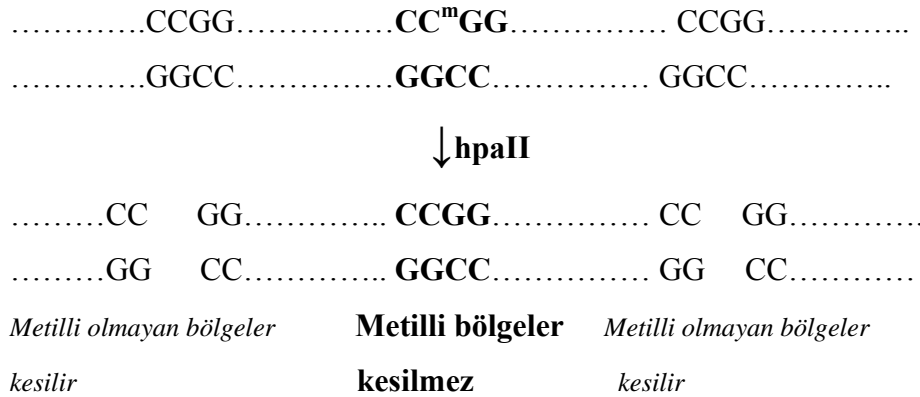
olmuştur. Hipometilasyon ile kromozomal yeniden düzenlenmeler, heterozigozite kaybı (LOH) meydana gelmektedir. Genomun stabil kalabilmesi için metilasyonun normal seviyelerde tutulması gerekmektedir(139). Genomda yaygın demetilasyon kanser gelişiminde bir basamak olmaktadır (141).

Modifiye Restriksiyon Endonükleazlar

DNA'nın durumu **restriksiyon enzim** analizi ile saptanabilir. Metile sitozini taşıyan CG dinükleotidinin MspI ve HpaII restriksiyon enzimlerince kesim profili farklılıklar gösterir (142). Restriksiyon enzimi HpaII'nin DNA'yı tanıma ve kesme dizisi CCGG dir; ancak ikinci sitozin metillenmemişse DNA'yı kesmeyecektir. Diğer bir restriksiyon enzimi olan MspI de aynı CCGG dizisini tanır ve ikinci sitozin metilli olsun ya da olmasın kesim yapar (şekil 17). Eğer DNA segmenti metilli değilse, iki enzim de aynı restriksiyon bantlarını oluşturacaktır (14).

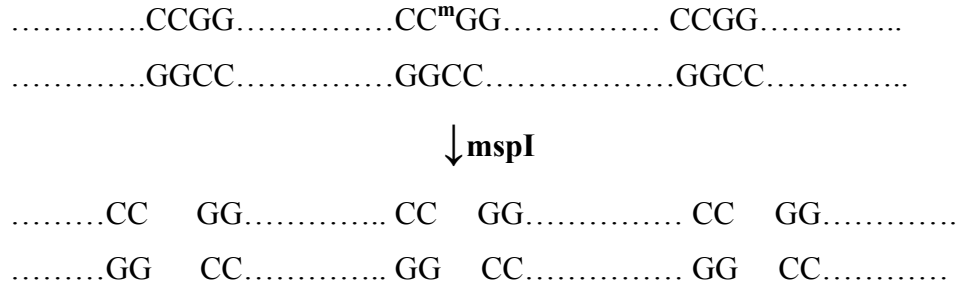
Şekil 16'da gösterildiği gibi CCGG dizilerinden biri metilli ise, HpaII ile kesim yapıldığında farklı bantlar oluşacaktır .

a. Hpa II



Şekil 16- HpaII enzim çalışma mekanizması

b. MspI



Metilli olsun ya da olmasın bütün bölgeler kesilir

Şekil 17- MspI enzim çalışma mekanizması

2. POST-TRANSKRİPSİYONEL MEKANİZMALAR

RNA İNTERFERANS (RNAi)

RNA interferans, çift zincirli RNA (double stranded RNA; dsRNA) tarafından başlatılan dizi spesifik post-transkripsiyonel gen sessizleştirme sürecidir(143). miRNA genlerinin %50'den fazlası kanserle ilişkili genomik alanlarda veya frajil sitelerde lokalizedir.

Bunların tümör supresör gibi davranarak onkogenleri inhibe ettikleri veya tam tersi olarak onkogen gibi hareket ederek tümör supresörleri inhibe ettikleri, miR-15 ve miR-16'nın insan kanserlerinde tümör supresör olarak hareket edebileceği gösterilmiştir. En sık görülen lösemi tipi olan kronik lenfositik lösemilerde miR-15 ve miR-16'nın delesyona uğradığı ve seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir. Hatta Bcl2'yi inhibe etme özelliğinden faydanılarak kanser tedavisinde önerilmektedir (144).

Buna tezat olarak onkogen gibi davranan miRNA 'lar da var: miR155, B hücre lenfomalarında, Hodgkin's lenfomada, Burkitt lenfomada ve insan meme kanserinde (145), miR21 ise meme kanserinde aşırı eksprese edilmiştir. Tümör supresör gen inhibitörü gibi davranmaktadır (146).

DNA METİLASYONUNUN GÖREV ALDIĞI OLAYLAR

DNA metilasyonu genomik imprinting, proto-onkogen aktivasyonu, tümör supresör gen inaktivasyonu, bazı kanser türlerinin başlatılması ve sürdürülmesi, somatik hücre farklılaşması ve onkogenez, hücre, doku ve allel spesifik gen inaktivasyonu ya da reaktivasyonu, X inaktivasyonu, genetik tedavi ve yaşlanma, genomun aktif gen ya da kondanse bölgeler şeklinde yapılanması ve yerleşimi ve de apoptoziste rol oynamaktadır (120,147).

DNA metilasyonu ile genomun erken **embriyonik** gelişiminde, fertilizasyon sonrası genomun demetilasyonla genişletilmesinde ve blastokistin implantasyonundan sonra remetilasyonla yeniden şekillenmesinden sorumludur(113). **Oosit** gelişiminde ve imprinting olayında DNA metilasyonu esansiyeldir. **Spermatogenezis** için Dnmt 3a ve onunla ilgili protein olan Dnmt3I ve histon metil transferazlar Suv39hI ve Suv39h2 gereklidir (102).

X inaktivasyonu birkaç faktörle regüle edilir; non-coding RNAs (Xist ve Tsix), DNA metilasyonu, Histon metilasyonu, polycomb proteinleri ile (102). X' e bağlı kalıtılan fosfogliserat kinaz (Pgc-1) geninin sitozin metilasyonu X inaktivasyonuna sebep olmaktadır. Benzer çalışma hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hprt) geni için de yapılmış ve CpG metilasyonu ve X inaktivasyonu ilişkisi ortaya konmuştur (148,149).

Genomik imprinting genetik materyalin anneden veya babadan kalıtılmış olmasına bağlı olarak genin farklı ifadesidir. Genomik imprinting hem maternal hem de paternal allel var olduğunda oluşmakta ve bir allel ekspresse olurken diğeri inaktif kalmaktadır (150). DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu ile meydana getirilen genomik imprinting (151,152,153), gelişimsel ve pediatrik pek çok hastalıktan sorumlu epigenetik bir fenomendir. Prader Willi, Angelman sendromu, Beck-With Wiedemann sendromu (154,155) ve Silver Russel sendromu gibi (156) hastalıklarda genetik ve epigenetik mekanizmaları görmekteyiz. Prader-Willi sendromunda 15 nolu kromozomda genetik veya epigenetik bir mekanizmayla babadan, Angelman sendromunda ise yine aynı mekanizmayla anneden kalıtılan 15 nolu kromozom sorumlu olmaktadır. Beck-with Wiedeman sendromunda ise genetik ve epigenetik mutasyonla oluşan 11 nolu kromozomun imprinting kaybını görmekteyiz. Epigenetik regülasyon varyasyonu genetik çeşitlilik sebebidir ve bu değişiklikler hastalıklardan sorumludur.

Epigenetik değişiklikler pek çok hastalıkta şizofreni, bipolar bozukluk, otizm, sistemik lupus eritamatozus (SLE) gibi otoimmün hastalıklar (157), pediatrik sendromlar ve çeşitli kanser tiplerinde ve yaşlanmada gösterilmiştir (101,151).

Pediatrik sendromlar ve epigenetik ilişkisi son dönemlerde ilgi çeken konulardan biri daha olmuştur. Transkripsiyonun genomda değişiklik yapmadan, kalıtılabilir değişikliklerinden sorumlu başkaca da bir yöntem olan epigenetik, pek çok **pediatrik sendromdan** da sorumludur.

*DNA metil transferaz 3B(DNMT3B) ve ICF (immünodeficiency, centromeric instabilite ve facial anomaliler) (158).

* MECP2 ve RETT sendromu(159).

*ATRX ve ATR-X sendromu(a –talassemi / mental retardasyon, X’e bağlı kalıtım (160).

*DNA kısa tekrarları ve Facioscapulo humeral muscular distrofi (161,162).

ICF sendromu; immün yetmezlik, sentromerik bölge instabilitesi ve fasial anomalilerle görülen, nadir ve mendelian kalıtılan epigenetik kalıtıma uyan bir B lenfosit fonksiyon bozukluğudur. ICF hastalarında DNMT3B mutasyonu ile 1, 16 baze de 9 nolu kromozomun heterokromatik bölgesinde DNA’nın yeniden düzenlenmesi ile hipometilasyon görülmekte lenfosit mitojen stimülasyonu göstermektedir ki DNA metilasyonu lenfosit matürasyonunun son safhalarında gereklidir (132, 158).

Rett sendromunda ; MECP2’ de mutasyon vardır. MECP2’nin kodladığı protein metile DNA’yı bağlar ve transkripsiyonu baskılar. Oysa MECP2’de mutasyon olursa, aşırı akümüle olan abnormal gen ürünü kızlarda beyin gelişimini bozar ve hayatın ilk yıllarında mental retardasyon meydana gelir (159,163).

ATRX Sendromu: ATRX proteini kromatin üzerinde transkripsiyonel regülatör etkisi olan akrosentrik kromozomların kısa kolunda yer alan bir proteindir. Ribozomal DNA üzerinde transkripsiyonu kapatıcı etkisi vardır ki epigenetik metilasyonla oluşan protein inaktivasyonu ile meydana gelen aşırı tekrar dizileri, DNA’da inaktive kondanse bir protein ile abnormal ürünlerin neticesinde şiddetli mental retardasyon, fasial dismorfizm, urogenital anomaliler ve alfa talassemi meydana gelir (160).

Aicardi sendromu, corpus callosum agenezisi, retinal lakünler, epileptik nöbetler, gelişme geriliği ile giden X’ e bağlı gelişimsel bir hastalıktır. Erkeklerde X’e bağlı letal olduğuna inanılmaktadır. Aicardi sendromu olan monozigotik kız bebeklerinde MspI/HpaII enzimi metilasyona spesifik RFLP tekniği ile kültüre cilt fibroblast

hücrelerinde X'e bağlanan M27 problemleri kullanılarak epigenetik metilasyon ile erken embriyonik dönemdeki post zigotik mutasyon gösterilmiştir(164).

DNA metilasyonu hücre fonksiyonunun korunması için vazgeçilmezdir. Metilasyon kalıplarında meydana gelen değişiklikler **otoimmün hastalıklar, yaşlanma ve kanser** gelişiminde sıklıkla gözlemlenen değişikliklerdir. DNA metilasyon kalıbında meydana gelen değişiklikler T lenfositler üzerindeki inhibisyonun ortadan kalkmasına sebep olur. **SLE'de** T lenfositlerde hipometilasyon ile Lenfosit Fonksiyon Associated antijen 1 (LFA-1), (CD11q/ CD18) oranı aşırı artar. Prokaninamid ve Hidralazinin, lupus benzeri sendroma neden olmasında, muhtemel sebep olarak T hücre DNA metilasyonunun inhibe edilmesi söz konusudur (165). Klasik otoimmün hastalıklar olarak bilinen SLE (157,166) ve **Romatoid Artrite** genomda yaygın hipometilasyon görülmektedir. Bununla birlikte yaşlanmada da LFA-1 antijeninin arttığını görmekteyiz. Beraberinde otoimmün hastalıkların **yaşlanmaya** bağlı olarak artış sebebi açıklanabilmektedir ki yaşlanmayla kansere yatkınlığın artmasında yine DNA metilasyonunun rolü büyüktür. Yaşa bağlı olarak CpG adalarında metilasyon oranları artmaktadır. Böylelikle tümör supresör genlerin promoter bölgelerinde meydana gelen hipermetilasyon ile tümör supresör gen inaktivasyonu meydana gelmektedir. Bu durum bazı kanserlerin gelişiminde ve erken tanıda önemli olabilmektedir (165).

Toksikoloji ve epigenetik üzerine son zamalardaki araştırmalar ve epidemiyolojik çalışmalarda alternatif metilasyon mekanizmalarının karaciğerde toksikolojide önemli olduğu gösterilmiştir. Antikonvülzanların ve de polihalojenize maddelerin metabolizmasında, kimyasal maddelerin hepatotoksik ve major karsinojenik etkilerinin oluşmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Arsenik detoksifikasyonu için metilasyon kullanılan bir mekanizmadır. Arsenik biyotransformasyonu metilasyon kapasitesine bağlıdır ve metilasyon kapasitesi arseniğe bağlı DNA hasar ve hastalıklarının gelişmesinde rol almaktadır (167).

Epigenetik olarak **kanser** oluşumu aberrant metilasyonla (sapkın metilasyonla) ve kimyasalların indüklediği alternatif metilasyonla meydana gelebilir(168). Kanser araştırmalarında son zamanlarda epigenetik en ilgi çeken konulardan biri olmuştur. İnsan tümörlerinde DNA metilasyon ve histon modifikasyonun bozulması bilinen gerçeklerdendir. Kanser hücrelerinde genel olarak DNA hipometilasyonu, tümör supresör genlerin promoter bölgelerinin hipermetilasyonu (169), kritik genlerin histon kodlarının değiştirilmesi, histone H4'ün trimetile olması ve global monoasetilasyonun

kaybı tespit edilen bulgulardır (163). Tümöre spesifik metilasyon sahalarının tespiti bireysel olarak DNA fingerprinting (parmak izi) gibidir (170). Bireye has ve özeldir.

Kanserde Metilasyon sahalarının saptanması ile; DNA fingerprinting, tümör erken tanısı, tümör subtiplerinin ayırt edilmesi, antitümör droglarla tedavinin planlanması, tedavinin takip edilmesi, metastazların araştırılması ve tümör gelişimini engelleyen koruyucu tedavilerin alınmasına olanak sağlayacaktır. Bu konu ile ilgili çalışmalar Larid tarafından 2003 yılında, de Vos tarafından 2005 yılında, Herranz ve Esteller tarafından 2006 yılında yapılmıştır (171, 172, 173). Çeşitli kanserlerde epigenetik mekanizmalar üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Epitelial kanserlerde müsin üretiminden sorumlu 11p15 genlerinde epigenetik metilasyonu ve histon modifikasyonu bisülfitle modifiye sekans tekniği kullanılarak gösterilmiştir (174). Renal hücreli kanserde Von Hippel Lindau (VHL) tümör supresör geni hipermetiledir (175,176). P16 tümör supresör geninin epitelial kanserlerde hipermetile olduğu tespit edilmiştir (177). Prostat kanserinde DNA metilasyon değişiklikleri ve genomik imprinting görülür. Epigenetik değişikliklerin benign prostat hiperplazisinin gelişiminden sorumlu olabileceği ve prostat karsinomu gelişiminde katkısı olduğu tespit edilmiştir. Benign prostat hiperplazisinden karsinom gelişinceye kadar ki süreçte etkili olmaktadır(178). Kolorektal karsinomada olduğu gibi.

Epigenetik değişiklikler, tümörün davranışını etkileyebilir. Hedef ilaçlarla epigenetik modifikasyonlar gözlenerek, hastalığın gelişiminin önlenmesinde ve hastalığın ya da kanserin kür tedavisinde etkili olunabilmektedir.

Bu amaçla bazı kanser tiplerinde tedavide kullanılan ilaçlar vardır: 5 azasitidin, 5 fluora urasil gibi. **5-azocytidine** DNA metil transferaz inhibitörüdür ki 5 -azocytidinin indüklediği hipometilasyon ile baskılanmış genetik aktivitenin yeniden reaktif olması sağlanmakta (120) ve **histon de asetilaz inhibisyonu** ile de kanser hücrelerinde apoptozis ve proliferasyonda duraklama meydana getirilmektedir. Histon de asetilaz inhibitörleri nörodejeneratif ve inflamatuvar hastalıklarda kullanılmaktadır. HDAİ ile nonhiston proteinlerin mesela transkripsiyon faktörleri, hücre iskelet proteinleri ve tümöregeneziste önemli olan diğer moleküler chaperonların asetilasyon seviyesi artmaktadır (179). Araştırmacılar sıçanlarda DNA metil transferaz inhibitörü olan 5-azo-deoxycytidine kullanarak, DNA metil transferaz aktivitesini kısıtladılar ve 113 kontrol grubu sıçanda intestinal adenomları geriletmeyi başarmışlardır (180).

Tablo 2: Epigenetik Modifikasyonlar ve Hastalıklarla İlişkisi

| HASTALIK/ DURUM | GEN | BİYOLOJİK DURUM | HASTALIK/ DURUM | GEN | BİYOLOJİK DURUM |
|--------------------|----------------------|--------------------|--|-------------------------|--------------------|
| MESANE | Çok sayıda gen | hipermetilasyon | YAŞLANMA | kromatin | Hipo/hipermet |
| BEYİN(GLİOMA) | RASSF1A | hipermetilasyon | ŞİZOFENİ | RELN | Hipermetilasyon |
| BEYİN(GLİOBLAST) | MGMT | hipermetilasyon | BİPOLAR HASTALIK | 11p? | Bilinmiyor |
| MEME | BRCA1 | hipermetilasyon | HAFIZA | MULTİPLE GEN | Hipo/hipermet |
| MEME | MULTİPLE GEN | hipermetilasyon | LUPUS | Retrovi- ral DNA | Hipometilasyon |
| SERVİKS | P16 | hipermetilasyon | KARDİYOVASKÜL ER | | |
| KOLON | MULTİPLE GEN | hipermetilasyon | ATEROSKLEROZİS | MULTİPLE GEN | Hipo/hipermet |
| KOLOREKTAL | L1 TEKRARLAR I | hipermetilasyon | HOMOSİSTEİNEMİ | MULTİPLE GEN | Hipometilasyon |
| ÖZEFAGUS | CDH1 | hipermetilasyon | VASKÜLER ENDOTELYUM | eNOS | Hipometilasyon |
| BAŞ/ BOYUN | P16,MGMT | hipermetilasyon | İMPRİNTİNG VE PEDİATRİK SENDROMLAR | | İmprinting |
| BÖBREK | TIMP-3 | hipermetilasyon | PWS/ AS | 15q | İmprinting |
| LÖSEMİ | P15 | hipermetilasyon | BWS | 11p | İmprinting |
| KARACİĞER | MULTİPLE GEN | hipermetilasyon | SRS | Kromo- zom 7 | İmprinting |
| AKCİĞER | P16,P73 | hipermetilasyon | UPD14 | 14q | İmprinting |
| LENFOMA | DAPK | hipermetilasyon | PHP, AHO, MAS | 20q | İmprinting |
| MYELOMA | DAPK | hipermetilasyon | RETT SENDROMU | MECP2 | Mutasyon |
| OVARYUM | BRCA1 | hipermetilasyon | ICF SENDROMU | DNMT3 | Mutasyon |
| OVARYUM | SAT2 | hipometilasyon | ATRX | ATRX | Kromatin yapısı |
| PANCREAS | APC | hipermetilasyon | FRAX | Üçlü tekrar | Sessizleştirme |
| PANCREAS | MULTİPLE GEN | hipometilasyon | FSHD | 3.3 kb tekrar | Kromatin yapısı |
| PROSTAT | BRCA2 | hipermetilasyon | ÜREME | | |
| RABDOMYOSARKOM | PAX3 | hipermetilasyon | OVARYAN TERATOMA | Ailesel genom yok | İmprinting |
| MİDE | SİKLİN D2 | hipometilasyon | CHM | Ailesel genom yok | İmprinting |
| TİMUS | POMC | hipometilasyon | BİCHM | Anne genomu | İmprinting |
| ÜRETELİAL | SATELLİT DNA | hipometilasyon | | | |
| UTERUS | Hmlh1 | hipermetilasyon | | | |

NOT: PWS: Prader Willi sendromu, AS: Angelman Sendromu, BWS: Backwith Wideman sendromu, SRS: Silver –Russel Sendromu, UPD14: uniparenteral dizomi 14, PHP: psödohipoparatiroidizm, AHO: Albright Hereditör Osteodistrofisi, MAS: Mc-Cune Albright sendromu, ICF: immünyetmezlik, sentromerik instabilite, fasial anomaliler, ATRX: alfa talasemi/mental retardasyon sendromu, FRAX: frajil X, FSHD: Fasioskapulohumeral distrofi, CHM: komplet mol hidatiform, BİCHM: familyal biparental CHM (181).

EPIGENOMİK

Epigenomik, epigenetik ve genom bilimlerinin yeni bir dalıdır ve tek bir genden çok daha büyük bir alanda yani tüm genom çapında meydana gelen epigenetik modifikasyonları inceler. Bu konudaki çalışmalar henüz çok yeni olduğu için elimizdeki veriler de çok yeterli olmamakla beraber, bu konu üzerindeki çalışmalar yoğunluk kazanmaktadır. Epigenetik bilgiler doğası gereği multiplektir yani bir gende belki de yüzlerce metilasyon alanını belki de düzinelerce histon modifikasyon alanını gösterecektir. Epigenetik bilgi, kantitatifdir, dokuya özgüdür ve dokudaki metilasyon oranları farklı yoğunluklarda olabilir. Ayrıca gendeki regülatör dizilerin anlaşılmasına olanak sağlayabilir. Düşünüldüğünde birçok organizmada olduğu gibi insan genomunda da kodlanmayan diziler, kodlanan dizilere göre genomda büyük yer kaplamaktadırlar ve bu bölgelerin gen regülasyonunda rol aldığı düşünülmektedir. DNA'nın nükleus içindeki topolojik konformasyonunun epigenetik olarak kontrol edildiği düşünülmektedir ve son yıllarda yapılan çalışmalar bu düzenlemenin gen regülasyonunda çok önemli rolü olduğunu göstermektedir.

Geçmişte teknolojik olanakların yetersizliğinden ötürü, epigenetik verilerin elde edilmesi yavaş ve güç olabiliyordu ancak günümüzde mikroarrey yöntemlerinin devreye girmesiyle bilgi akışı hızlanmıştır (182,183).

DNA METİLASYON ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

DNA'daki metilasyon sahalarıyla ilgili çalışmalar sitozin ile onun metile yani 5 metil sitozin formatındaki halinin saptanması esasına dayanmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmaları 3 sınıfta toplayabiliriz (184).

- 1-DNA'nın metilasyona duyarlı bir restriksiyon endonükleaz ile kesilmesi
- 2-DNA'nın sodyum bisülfat ya da metabisülfat ile kimyasal olarak modifikasyonu
- 3-5metilsitozinin imünopresipitasyonu ile genomun metilenmiş ve metillenmemiş bölgelerinin birbirinden ayrılması.

1-Restrüksiyon Endonukleazlara Dayanan Teknikler:

RLGS tekniği (Restriction landmark genome scanning): İki boyutlu bir yaklaşımla uygulanan RLGS, restriksiyon enzim polimorfizmleri ve DNA metilasyon duyarlı bölgelerini kullanır ancak uzun zaman alıcı ve duyarlılığı düşük bir yöntem olduğu için günümüzde pek tercih edilen bir yöntem olmamaktadır (182, 194).

Hibridizasyon yöntemi: Metilasyona duyarlı Not I enzim kesiminden elde edilen fragmentlerin biyotinle işaretlenmesinden sonra BAC arraylerinde hibridizasyonu kullanılmıştır. Bu yöntem daha başarılıdır. Bu yöntem ratlarda ve insanlarda çeşitli hücrelerde; astrositik ve periferik kan lenfositlerinde yapılan çalışmalarda farklı metilasyon sahaları saptanmıştır (182).

HELP yöntemi (HpaII tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR) :

Restriksiyon enzimiyle microarray tekniğinin birlikte kullanılması esasına dayanır.

Bu yöntemde, metile olmayan DNA ve genomik DNA'nın farklı hibridize olmasından yararlanır ve HpaII kesim fragmentleriyle, metilasyona duyarlı olmayan MspI fragmentlerinin birlikte hibridizasyonu ile gerçekleştirilir (182, 195).

2-Bisülfite Tekniği: Genler üzerindeki metile sahaların tespitine dayanan yeni bir yöntem olan bisülfite tekniği, DNA'nın 5metil sitozin sahalarının sekansına dayanmaktadır (185). Bisülfite genomik sekansı ilk kez Frommer ve arkadaşları tarafından tanımlanan bir yöntemdir (186). Sodyum bisülfite genomda unmetile sitozinlerin urasile dönüştürür. Metile sahalar ise dirençli kalmaktadır. Bu durum ilk kez Hayatsu tarafından açıklanmıştır (187).

Metilasyona Spesifik PCR Yöntemi (MsPCR) :

Bu yöntem, DNA'daki CpG adalarındaki metile sahaları göstermek için kullanılan bisülfite dayalı PCR tekniğidir. Öncesinde CpG sahalarındaki Metile ve unmetile sahaların gösterilmesi için DNA sodyum bisülfite ile modifikasyona uğratılır. DNA'daki unmetile olan sitozinler, sodyum bisülfite ile urasile dönüştürülürler. Oysa metile olan CpG sahaları herhangi bir değişime uğramazlar. Ardından U ve M primerleri kullanılarak PCR yapılarak metile ve unmetile sitozin alanları ya sekans analizi ile birebir ya da jelde yürütülerek tespit edilir. Bu yöntem ilk defa 1996 yılında Herman ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir yöntemdir. P16, p15, E-kadherin ve vVon Hippel-Lindau tümör supresör genlerindeki transkripsiyonel inaktivasyon, promoter bölge hipermetilasyon değişiklikleri metilasyona spesifik PCR yöntemiyle gösterilmiştir (175).

ChIP on chip yöntemi: ChIP yöntemi microarrey çiplerine uygulandığında hızlı ve güvenli analizler yapılabilir. Bu yöntem, uygulayıcısına esneklik sağlamakta ve bölgesel ya da genel antibodiler kullanılarak istenilen bölgeye ait histon modifikasyonları gösterilebilmektedir(184,189).

EPİGENOM PROJESİ

Sağlık ve hastalıkların kökenini belirlemede epigenetik değişikliklerin rolü üzerine tartışmalar artarken, araştırmacılar da İnsan Genom Projesi'nin karşısına yeni bir rakip çıkarmaya hazırlanıyorlar.

Projenin asıl amacı, kişilerin hayatlarında meydana gelebilecek olan ve ileride kanser veya başka hastalıklara neden olması muhtemel epigenetik değişiklikleri belirlemektir. Bunun yanında projeye, nesilden nesile aktarılan ve sağlığa etki edebilecek kalıtsal değişikliklerin de saptanması amaçlanmaktadır (190,191,192).

İngiltere'deki Sanger Enstitüsü ile Almanya'daki Epigenomics şirketi, DNA'ya metil grupların eklenmesiyle ortaya çıkan varyasyonları belirlemede yolun yarısına gelmiş durumdadır. Araştırmacılar son yıllarda epigenom projesinin gerekliliğini kavrayıp, Avrupa'da ve Amerikada Epigenom araştırma grubu oluşturdu ki son iki yılda çalışmalar bu konu üzerinde yoğunlaşmıştır.

Avrupa'da Sanger Center, Epigenomics AG ve The Centre National de Génotypage birlikte Human Epigenome Consortium'u kurdular. Kromozom 6 üzerindeki MHC bölgesinde bulunan 150 lokusu incelediler. Araştırma 4 kromozomu kapsayacak şekilde genişletildi. İkinci bir grup ise 37 araştırma grubunu kapsayan Epigenome Network of Excellence adıyla kuruldu. Ayrıca son olarak da AB tarafından finanse edilen ve 11 akademik merkez ile 2 şirketi kapsayan "HEROIC" (High Throughput Epigenetic Regulatory Organisation in Chromatin) kuruldu. Ayrıca ABD'de The American Association for Cancer Research (AACR) grubunun çalışmalarıyla başlatılan, dünya çapında katılımı gerçekleştirilen bazı workshop çalışmalarında uzun dönemde 1bc çözünürlüğünde metilasyon paternlerinin ortaya çıkarılması konusunda fikir birliğine varıldı (189).

III. MATERYAL VE METOD

HASTA VE KONTROL GRUBU

Hasta Grubu:

Kolorektal karsinomada kanser evrelemesi ve epigenetik rolün araştırılması, kromozomal ve genomik instabilitenin gösterilebilmesi için Cumhuriyet Üniversitesi Genel Cerrahi kolorektal cerrahi polikliniğine başvuran makattan kanama, dışkılama alışkanlığında değişiklik ve barsak tıkanması ön tanısıyla yatırılmış kolonoskopi ile biyopsi yapılmış yaşları 26- 78 arasında olan 23 hasta değerlendirmeye alınmıştır. Hastalardan ameliyat olmadan önce kromozom analizi için 2cc heparinize kan periferik kan kültürü ve kromozom analizi için, kandan DNA izolasyonu için yine 2cc EDTA'lı tüpe kan alınmıştır. Hasta ameliyat olurken ameliyathane şartlarında veya ameliyat sonrası patoloji bölümünün de ortaklığı ile hastadan tümoral olduğundan şüphe edilen bölgelerden dokudan DNA analizi için doku biyopsisi yapılmıştır. Hastalar patolojik olarak evrelendirilmiştir.

Kontrol Grubu: Yaşları 23-39 arasında olan 21 hasta kromozom analizi ile kromozom aberasyonu ve beraberinde mikronükleus araştırılarak genomik instabilite için değerlendirilmeye alınmıştır.

1- PERİFERİK KAN LENFOSİT KÜLTÜRÜ

- a- İçinde 5ml besiyeri (chang medium + aynı firmaya ait fitohemaglütinin ilave edilmiş) bulunan her tüpe 0.3 ml heparinize edilmiş periferik kan eklendi ve 72 saat 37° C'de etüvde inkübe edildi.
- b-Hasat işlemine geçmeden iki saat önce her tüpe 0.1 ml . colchine (10 mg/ml) eklenerek lenfositler metafazda durduruldu.
- c-Ekimden 72 saat sonra etüvden çıkartılan kültür 7 dakika 1200 rpm/dk' da santrüfuj edildi.
- d- Hücre kümesinin üstünde kalan kısım atıldıktan sonra 7 ml hipotonik solüsyon(0,075 M KCL) eklendi ve 10-15 dakika oda sıcaklığında (20°C) bekletildi.

e-1200 rpm/dk'da santrüfuj edilip üstündeki kısım atıldıktan sonra hücre kümesi, her yıkama için ayrı ayrı taze olarak hazırlanan 7 ml fiksatif (3 kısım metanol +1 kısım glisial asetik asit) ile her defasında 1200 rpm/dk' da santrüfuj edilerek 3 kez yıkandı. f-son yıkamadan sonra tüpte kalan hücre süspansiyonu temiz, kuru lamlara damlatılarak yayıldı.

Hipotonik Solüsyonu: 2,796 gr KCl 500 ml distile suda çözülerek hazırlanır.

TRİPSİN- GİEMSA BANDLAMA

a- Boyama işlemine geçmeden önce hazırlanan preparatlar 6 saat 65°C'de etüvde eskitildi.

b-Eskitilen preparatlar solid band ve GTG bandlama tekniklerine tabi tutuldular.

TAMPONLARIN HAZIRLANMASI

FOSFAT TAMPONU

0,025 M KH_2PO_4 3.4 g/lt

% 50 NaOH ile PH 6.8' e ayarlanır.

PBS(Fosfat Tampon Tuzu):

8,0 gr NaCl

0.2 gr KCl

0,92 gr Na_2HPO_4

0.2 gr KH_2PO_4

PH : 7.0'ye ayarlanarak 1 lt distile suda çözülür.

Eskitilen preparatlar, Solid ve GTG bandlama tekniklerine tabi tuuldular.

SOLİD BAND:

5 ml Giemsa boya süzülerek, 70 ml fosfat tamponunda çözülür.

Solid band yapılacak preparatlar 15 dakika bu boya şalesinde bekletildi.Yıkanarak kurutulduktan sonra değerlendirildi.

GİEMSA TRİPSİN GİEMSA BANDLAMA (GTG BANDLAMA)

Hazırlanan fosfat tamponu ve PBS tamponu kullanılarak boya şaleleri hazırlandı.

1.şaleye: 35mg Tripsin + 70ml PBS

2.şaleye: 70 ml PBS

3.şaleye. 70 ml PBS

4.şaleye: 5ml Giemsa+ 70 ml fosfat tamponu konuldu.

Eskitilerek hazırlanan preparatlar 12-60 sn arasında 1. şalede bekletildi. Bekletme süreleri bandın tutup tutmasına göre ayarlandı.1.şaleden hemen sonra bekletmeden 2.şalede yıkandı. Hemen ardından reaksiyonun devam etmemesi için 3. şalede tekrar yıkanarak, 4.şalede boyama işlemine tutuldu. Boya şalesinde 10-15 dakika arasında tutuldu.

Solid ve GTG bandı yapılan hasta preparatları ve kontrol grubundan hazırlanmış preparatlar karyotip analizi için önce solid band ve ardından GTG bandı yapılmış olan preparatlarda 10x 'lık daha sonra da 100x 'lık büyütme ile immersiyon damlatılarak değerlendirildi.

Aynı preparatlar daha sonra 5000 hücre hedef alınarak mikronükleus analiz işlemine tutuldu. Burada oran haline getirilen mikronükleusların sayısal olarak bulunan değerleri biyoistatistik Mann Withney U testi ile değerlendirildi.

2-KANDAN DNA İZOLASYONU

Hasta ve kontrol bireylerinden 2'şer ml alınan kan DNA izolasyonuna kadar buzdolabında -20°C'de saklanmıştır.DNA izolasyonu Nukleo Spin Blood DNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır.

KANDAN DNA İZOLASYON İŞLEMİNİN YAPILIŞI

200 µl kan, 25 µl Proteinase K ve 200 µl B3 tamponu vortex (VELP) ile 10-20 saniye karıştırıldıktan sonra 70°C'de 15 dakika bekletildi. Her örneğe 210 µl etanol katılarak vortex cihazında 10 saniye karıştırıldı. Lizatlar Nucleo Spin Column (NSBC)'a yüklenerek 11000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek lizatın tam süzülmesi sağlandı. NSBC'a 500 µl BW katılarak 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. NSBC'a 600 µl B5 eklenerek 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

Kurutma: NSBC'yi yeni tüpe alarak 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj ile kurutma işlemi yapıldı. 1,5 ml'lik Eppendorf tüpe NSBC yerleştirildi. Üzerine önceden ısıtılmış BE tamponu 100 µl katılarak 1 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlemler sonunda elde edilen DNA çözeltileri +4°C'de 1 gün bekletildikten sonra etiketlenerek -20 °C'de saklandı.

3-DOKUDAN DNA İZOLASYONU

Yaklaşık 100 mg doku bir tüpe konularak üzerine 500 µl STE tamponu ilave edildi. Tampon ilave edildikten sonra ince bir makas yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Üzerine 25 µl 10 mg/ml proteinaz K ve %10'luk SDS ilave edildi. Yavaşça karıştırılarak 55 °C'de 2 saat inkübe edildi. Belli aralıklarla karıştırıldı. 500 µl PCI ilave edilerek hafifçe karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 7000 g'de 5 dakika santrüfuj edildi. Üst berrak tabaka bir mikropipet yardımıyla alınarak temiz bir tüpe aktarıldı (interfazdaki proteinlerin alınmamasına özen gösterildi). -20°C'de soğutulmuş olan 1ml absolute alkol (etanol) ilave edildi. 7000 g'de 10 dakika santrüfuj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Alkol uzaklaştırılarak pellet %70'lik alkol ile yıkandı ve 37°C'de 10 dakika kadar kurumaya bırakıldı. Pellet 100 µl distile su ilave edilerek yeniden çözünmesi sağlandı.

4-RESTRÜKSİYON ENZİM TEKNİĞİ İLE GENOM METİLASYON PROFİLİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ :

Kolorektal kanser hastalarına ait olan kan ve doku DNA'ları mspI ve HpaII restrüksiyon endonuklezlar ile kesime uğrattılar. Böylelikle elde edilen kesim profilleri, %1'lil agaroz, 1x TAE tamponunda yürütüldü ve jeller etidyum bromid ile boyandı. Aşağıda MspI ve HpaII enzimleri ile hem kan hem de dokuda DNA kesim çalışması yapıldı.

MspI enzimi kan örnekleri (24 hasta için) :

Distile su : 12 µl x 24 = 288 µl

RE: 1 µl x 24 = 24 µl

RE Buffer: 2 µl x 24 = 48 µl

Toplam : 360 µl, DNA(kan): 5 µl

Her bir örnek için ise: (360/ 24) = 15 mix + DNA (kan) : 5 µl = 20 µl mix

MspI enzimi doku örnekleri (24 hasta için):

Distile su : 13µl x 24 = 312 µl

RE: 1 µl x 24 = 24 µl

RE Buffer: 2 µl x 24 = 48 µl

RNA az: 2 µl x 24 = 48 µl

Toplam : 432 µl DNA(doku): 2 µl

Her bir örnek için ise: (432/ 24 =)18 µl + DNA(doku): 2 µl = 20 µl mix

İle kesim yapıldı ve tüm gece 37'de inkübasyona bırakıldı.

HpaII enzimi kan örnekleri için:

Distile su: $12 \mu\text{l} \times 24 = 288 \mu\text{l}$

RE: $1 \mu\text{l} \times 24 = 24 \mu\text{l}$

RE Buffer: $2 \mu\text{l} \times 24 = 48 \mu\text{l}$

Toplam= $360 \mu\text{l}$, DNA: $5 \mu\text{l}$

Her bir örnek için ise: $(360/24) = (15 \text{ mix} + \text{DNA(kan)}) = 5 \mu\text{l} = 20 \mu\text{l mix}$

HpaII enzimi doku örnekleri için:

Distile su : $13\mu\text{l} \times 24 = 312 \mu\text{l}$

RE: $1 \mu\text{l} \times 24 = 24 \mu\text{l}$

RE Buffer: $2 \mu\text{l} \times 24 = 48 \mu\text{l}$

RNA az: $2 \mu\text{l} \times 24 = 48 \mu\text{l}$

Toplam : $432 \mu\text{l}$ DNA(doku): $2 \mu\text{l}$

Her bir örnek için ise: $(432/24 =)18 \mu\text{l} + \text{DNA(doku): } 2 \mu\text{l} = 20 \mu\text{l mix}$

İle kesim yapıldı ve tüm gece 37° de inkübasyona bırakıldı. Tüm kan ve doku örnekleri %1' lik agaroz jelde yürütüldü.

5 - AGARUZ JEL ELEKTROFOREZ

500 mg agaroz (ultra pure) 50 ml 1x TAE tamponuna konularak mikrodalga fırınında ısıtılmayla çözüldü.

Elimizi yakmayacak sıcaklığa gelinceye kadar soğutulup içine $5 \mu\text{l}$ ethidium bromid ilave edildi ve hafifçe karıştırıldı.

Jel tankına(Midicell EC-350) tarak yerleştirilip ardından jel dökülerek donması beklendi.

Jel donduktan sonra tarak çıkarılarak, jel içerisinde TAE bulunan tanka yerleştirildi.

$20 \mu\text{l}$ RE kesim ürünleri $,5 \mu\text{l}$ loading boya tamponu(fermentas) ile karıştırıldıktan sonra jele yüklendi.

75 mA ($90-100 \text{ V}$) de yaklaşık 45 dakika akım verildi (Güç kaynağı: EC 135 90).

Jellerdeki kesim profilleri jel görüntüleme sistemine (Vilber Lourmat Marne La Valle, Fransa) konulup 260 nm boyunda UV ışık altında değerlendirildi ve fotoğraflandı. Daha sonra kesim profilleri scaine image adı verilen jel plot görüntüleme yöntemiyle değerlendirildi. Jel görüntüleri grafik haline getirilerek mspI enzimi ve Hpa II enzimi kesim farklılıkları araştırıldı.

6- SCION IMAGE JEL PLOT GRAFİK TEKNİĞİ:

Bu yöntem, jel görüntülemesinden elde edilen görüntülerin, grafik haline getirilmesi işlemine dayanmaktadır. Buradan elde ettiğimiz grafikleri yorumlayarak, kan ve dokudaki MspI ve HpaII enzim kesim profilleri grafik haline getirilerek, yorumlanmıştır. Bu konu hakkında daha fazla bilgi için www.scioncorp.com adresinden faydalanılabilir.

IV.BULGULAR

- 1-Hastalardan kromozom analizi
- 2-Mikronukleus testi
- 3- Hastların patoloji raporları
- 4-Metilasyona spesifik restriksiyon enzim kesim profilleri



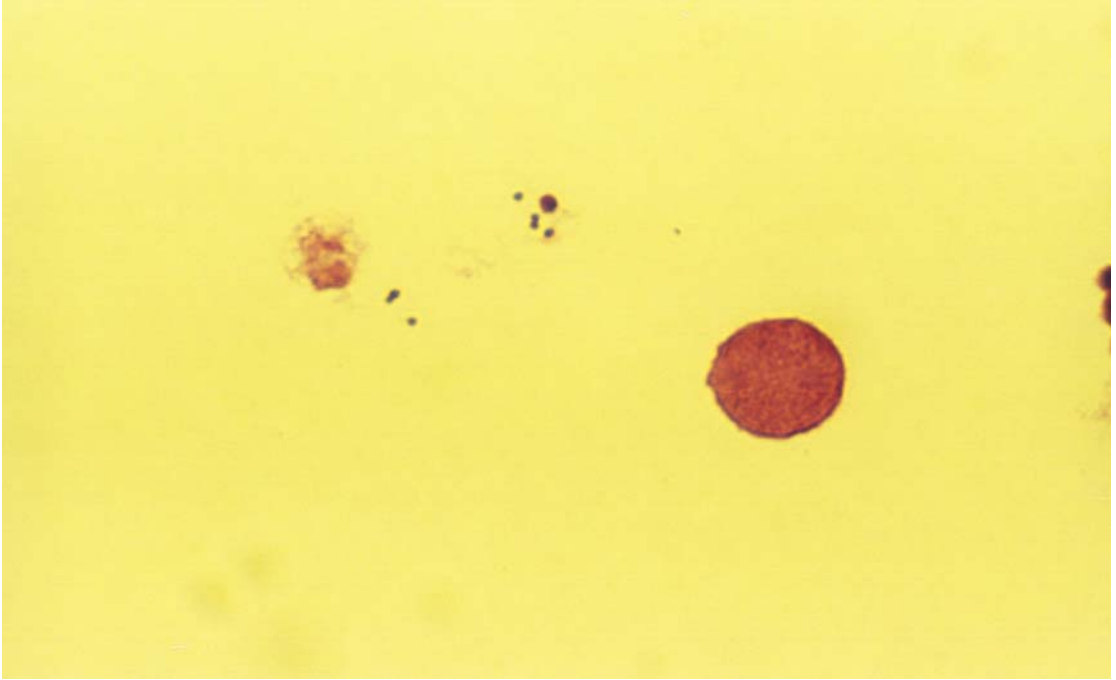
Şekil 19- Hasta grubu GTG Bandlama ile kromozom analizi



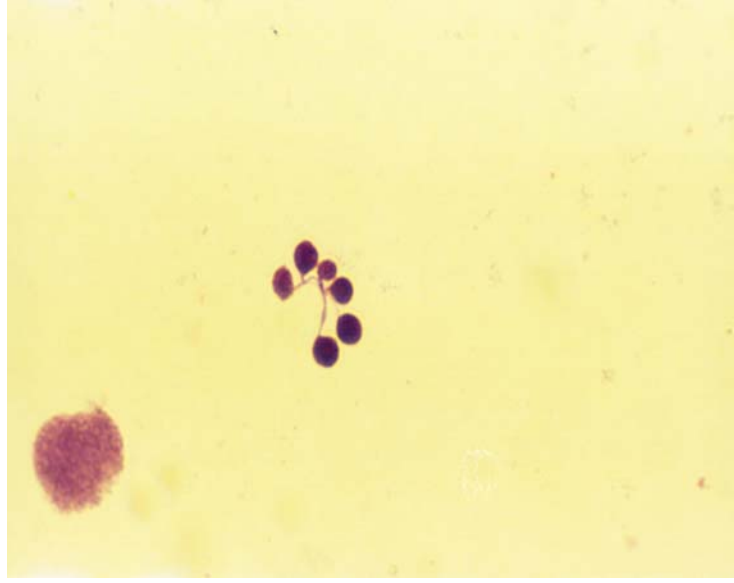
Şekil 20- Hasta grubunda solid bandlama ile kromozom analizi ve beraberinde zincir koloni formatında mikronukleuslar



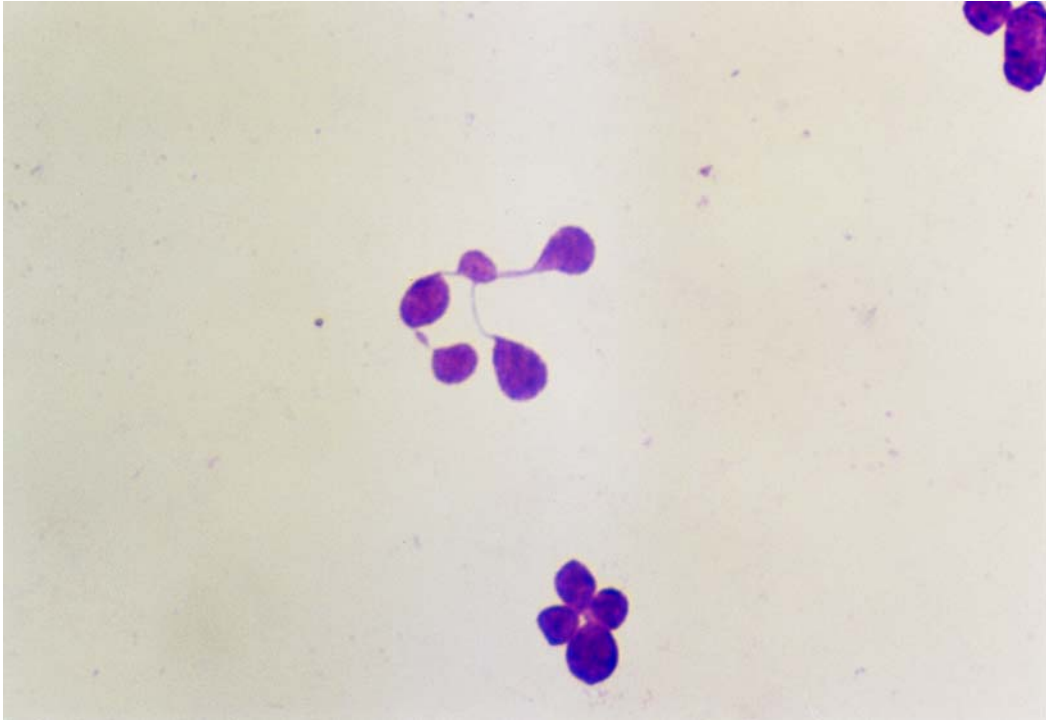
Şekil 21-Hasta grubuna ait GTG bandlama



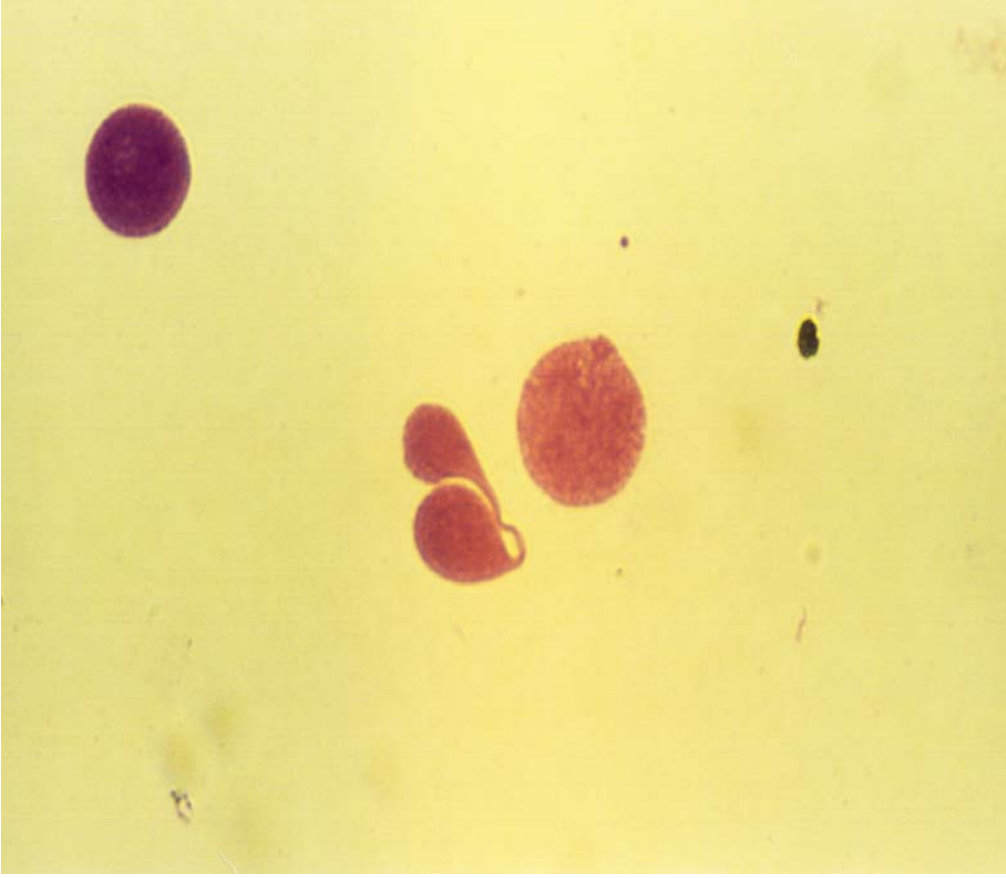
Şekil 22-Hasta grubuna ait mikronukleuslar



Şekil 23-Hasta grubuna ait zincir mikronükleuslar



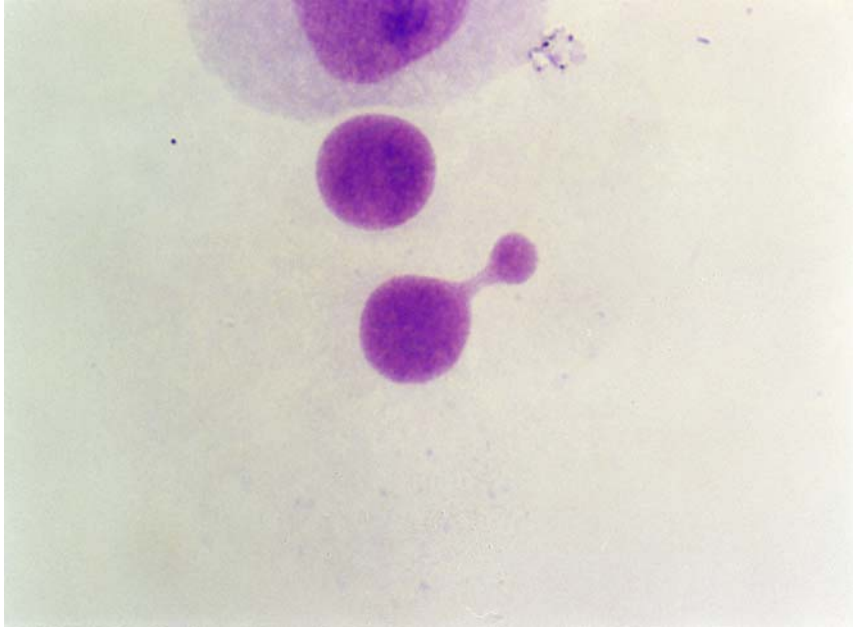
Şekil 24- Hasta grubuna ait anafaz köprüleri



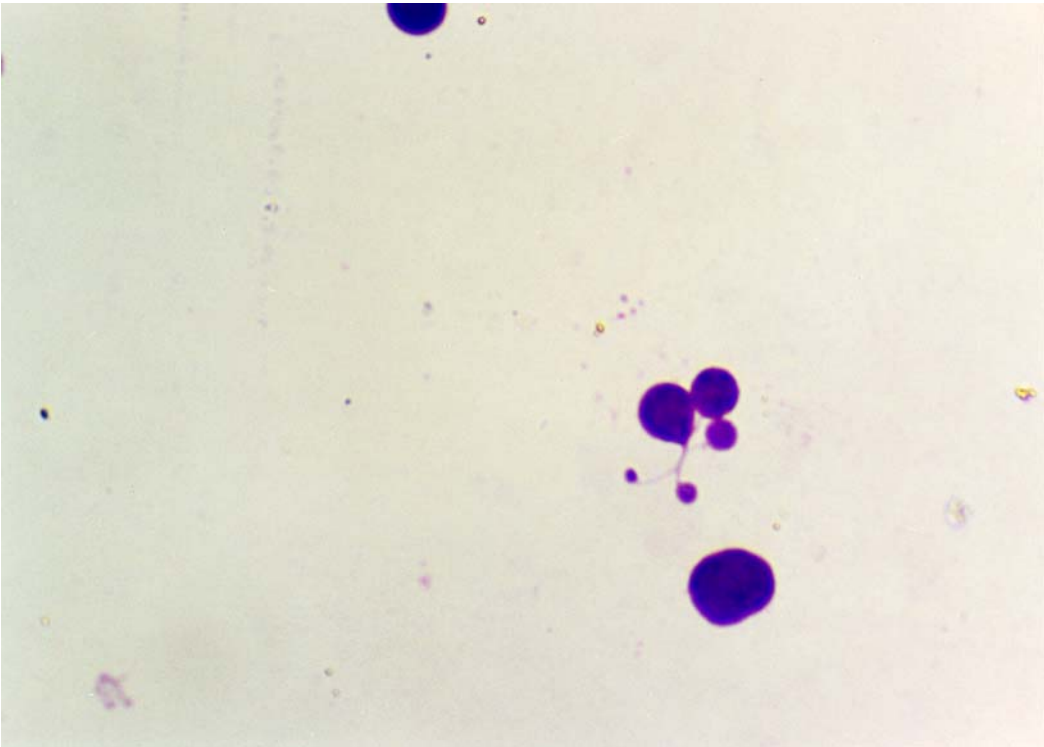
Şekil 25- Hasta grubuna ait anafaz köprüsü



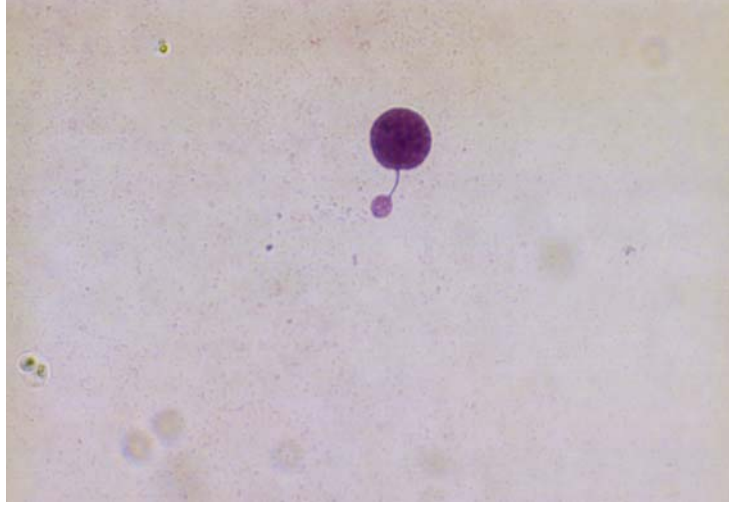
Şekil 26- Kontrol grubuna ait anafaz köprüsü



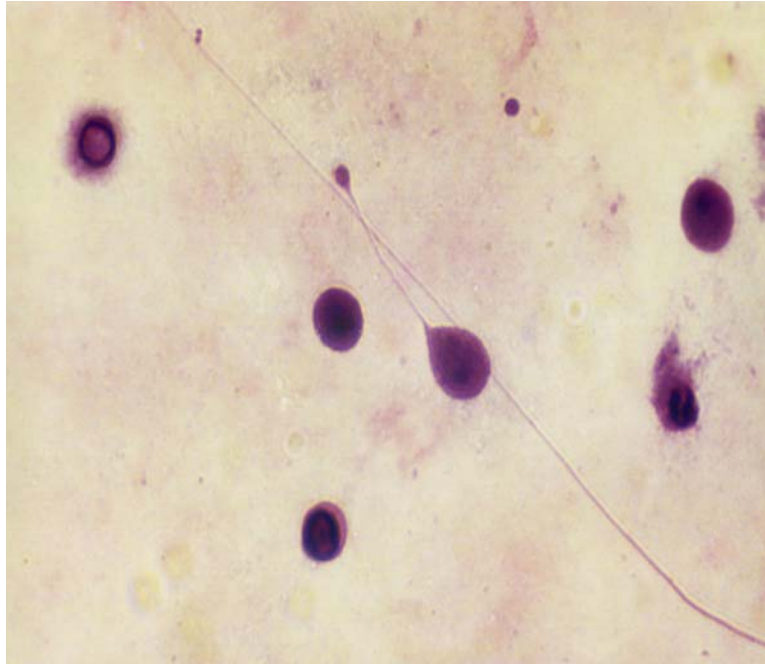
Şekil 27- Kontrol grubuna ait nuklear tomurcuk



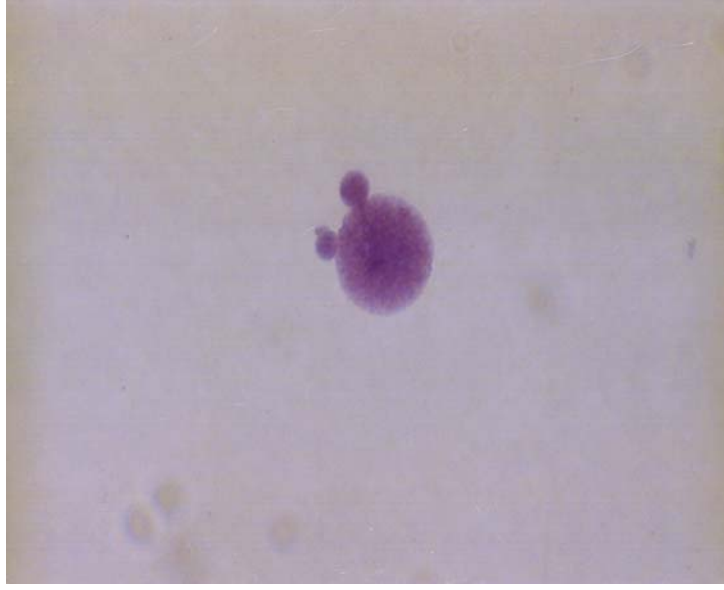
Şekil 28- Kontrol grubuna ait zincir mikronükleuslar



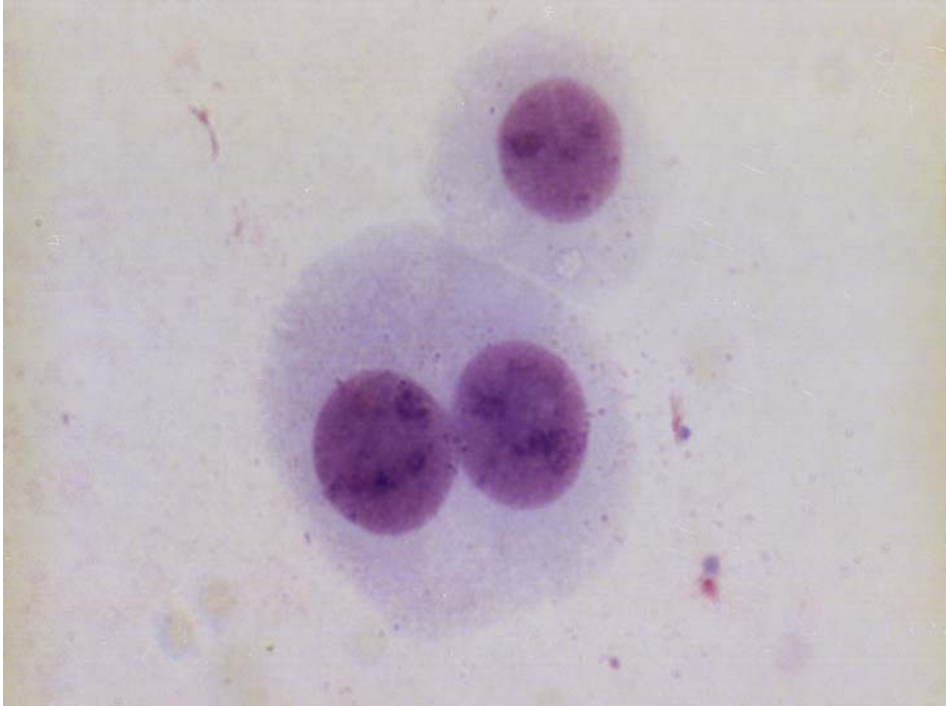
Şekil 29- Kontrol grubuna ait bağlı mikronukleus



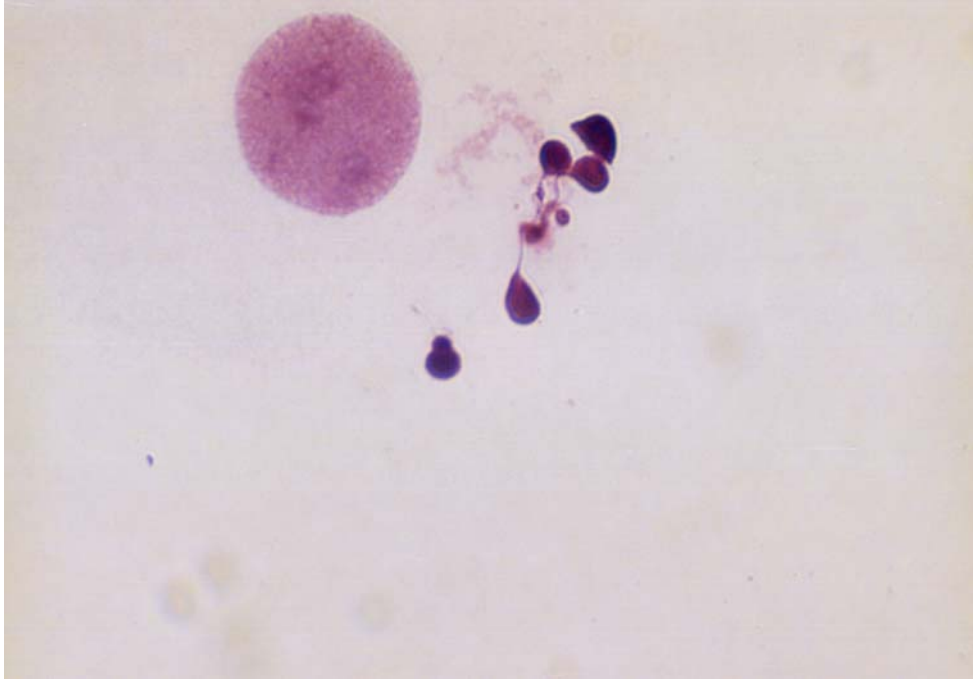
Şekil 30-Kontrol grubunda bağlı mikronükleus görünümü



Şekil 31-Kontrol grubunda bağı mikronükleuslar, nüklear tomurcukların görünümü



Şekil 32-Kontrol grubuna ait çift nükleuslu hücre



Şekil 33- Kontrol grubu zincir şeklinde anafaz köprüleri ve mikronükleuslar



Şekil 34-Kontrol grubu nükleer tomurcuk

Tablo 3: Hasta Grubunda Mikronükleus Oranları ve Tümör İlişkisi

| No | Yaş | C | MN sayısı | Anafaz köprüsü | Nükleer budd sayısı | Patoloji Raporu | Grade | TNM | Karyotip |
|----|-----|---|------------|----------------|---------------------|---|----------------------|--|----------|
| 1 | 70 | K | 193/ 5217 | 37 | 59 | Adenokarsinom | Grade 2 Orta dif | pT ₃ N ₀ M _x | 46,XX |
| 2 | 62 | E | 454/ 5124 | 127 | 243 | Adenokarsinom Müsinöz tip | Grade 3 Az dif. | pT ₃ N ₁ M _x | 46,XY |
| 3 | 54 | E | 192/ 5724 | 41 | 91 | Adenokarsinom | Grade 2 Orta dif. | pT ₃ N ₀ M _x | 46,XY |
| 4 | 78 | E | 269/ 5755 | 166 | 120 | Adenokarsinom | Grade 2 | pT ₃ N ₁ M _x | 46,XY |
| 5 | 68 | K | 121/ 5395 | 31 | 43 | Adenokarsinom NOS | Grade 2 Orta dif. | pT ₃ N ₁ M _x | 46,XX |
| 6 | 60 | K | 156/ 5509 | 53 | 100 | Adenokarsinom NOS | Orta dif. | pT ₃ N ₁ M _x | 46,XX |
| 7 | 29 | E | 214/ 5544 | 27 | 103 | Müsinöz karsinom | Orta dif. | pT ₃ N ₂ M _x | 46,XY |
| 8 | 65 | E | 317/ 5241 | 317 | 124 | Adenokarsinom | Orta dif | pT ₃ N ₀ M _x | 46,XY |
| 9 | 58 | E | 169/ 5189 | 169 | 120 | Adenokarsinom Müsinöz tip | Grade 2 Orta dif. | pT ₃ N ₁ M _x | 46,XY |
| 10 | 70 | E | 188/ 5370 | 11 | 71 | Adenokarsinom NOS, müsinöz kompanenet olmaksızın | Grade 3 Az dif. | pT ₃ N ₁ M _x | 46,XY |
| 11 | 70 | E | 279/ 5294 | 144 | 171 | Akut Appendisit, lokal peritonit | ----- | ----- | 46,XY |
| 12 | 78 | K | 543/ 5684 | 21 | 90 | Kr. Kazeifiye granülamatöz iltihap(tbc) | ----- | ----- | 46,XX |
| 13 | 68 | K | 352/ 5268 | 68 | 148 | Müsinöz ca | Orta dif | pT ₃ N ₂ M _x | 46,XY |
| 14 | 52 | E | 190 / 5207 | 190 | 127 | Adenokarsinom | Grade 2 Orta dif | pT ₃ N ₂ M _x | 46,XY |
| 15 | 49 | E | 202/ 5703 | 19 | 82 | Adenokarsinom | Grade 2 Orta dif | pT ₃ N ₂ M _x | 46,XY |
| 16 | 82 | E | 223/ 5403 | 19 | 61 | Adenokarsinom | Orta dif | pT ₃ N ₂ M _x | 46,XY |
| 17 | 77 | E | 277/ 5000 | 44 | 79 | Adenokarsinom | Grade 2 | pT ₃ N ₁ M _x | 46,XY |
| 18 | 52 | E | 187/ 5185 | 33 | 65 | Adenokarsinom | Grade 2 | pT ₃ N ₀ M _x | 46,XY |
| 19 | 26 | K | 198/ 5395 | 17 | 80 | Müsinöz adeno ca | ----- | pT ₃ N ₂ M _x | 46,XX |
| 20 | 70 | E | 410/ 5168 | 80 | 178 | Adenokarsinom NOS | Grade 2 Orta dif | pT ₃ N ₁ M ₁ | 46,XY |
| 21 | 64 | E | 135/ 5391 | 10 | 46 | Appendektomi, lenfoid hiperplazi, lokalize peritonit | ----- | ----- --- | 46,XY |

Tablo 4: Kontrol Grubunda Mikronükleus Oranları

| N o | Ya ş | cinsiyet | sitogenetik | MN | AB | NB |
|--------|---------|----------|-------------|----------|------|----|
| 1 | 31 | E | 46,XY | 33/ 5452 | 2 | 17 |
| 2 | 27 | K | 46,XX | 60/ 5085 | 4 | 21 |
| 3 | 34 | E | 46, XY | 52/5153 | ---- | 1 |
| 4 | 28 | E | 46, XY | 26/5300 | 5 | 10 |
| 5 | 30 | E | 46, XY | 43/ 5090 | 9 | 38 |
| 6 | 13 | E | 46, XY | 16/5422 | ---- | 6 |
| 7 | 33 | K | 46,XX | 37/ 5055 | 3 | 15 |
| 8 | 19 | K | 46,XX | 38/5206 | 7 | 61 |
| 9 | 37 | K | 46,XX | 28/ 5045 | 6 | 11 |
| 10 | 35 | E | 46, XY | 21/ 5064 | 9 | 13 |
| 11 | 28 | E | 46, XY | 69/ 5104 | 3 | 32 |
| 12 | 39 | E | 46, XY | 163/5516 | 8 | 45 |
| 13 | 35 | E | 46, XY | 21/ 5038 | 7 | 10 |
| 14 | 32 | E | 46, XY | 85/ 5233 | 16 | 32 |
| 15 | 31 | E | 46, XY | 79/ 5230 | 15 | 36 |
| 16 | 32 | K | 46,XX | 108/5739 | 4 | 27 |
| 17 | 35 | K | 46,XX | 41/5068 | 3 | 24 |
| 18 | 26 | K | 46,XX | 54/5097 | 10 | 33 |
| 19 | 32 | E | 46, XY | 129/5212 | 22 | 61 |
| 20 | 25 | K | 46,XX | 88/ 5114 | 3 | 23 |
| 21 | 34 | K | 46,XX | 183/5258 | 25 | 50 |

Tablo 5: Mikronukleus Testi için Çalışmaya Alınan Grup Değerlendirmesi

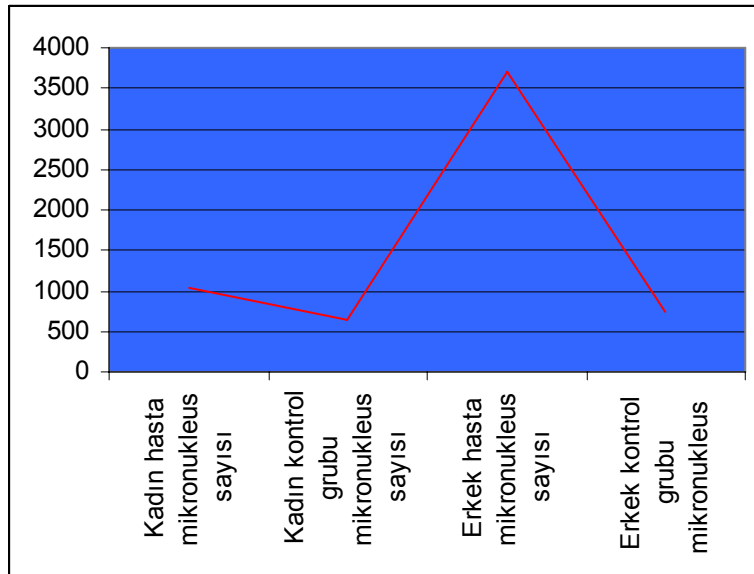
| Çalışmaya alınan kişi sayısı | Cinsiyet grup | Sayısı |
|------------------------------------|----------------|--------|
| Hasta Sayısı 21 | Erkek hasta | 15 |
| | kontrol sağlam | 13 |
| Kontrol grubu 21 | Kadın hasta | 6 |
| | kontrol sağlam | 8 |

Tablo 6: Kontrol Grubunda Mikronukleus Sayımı

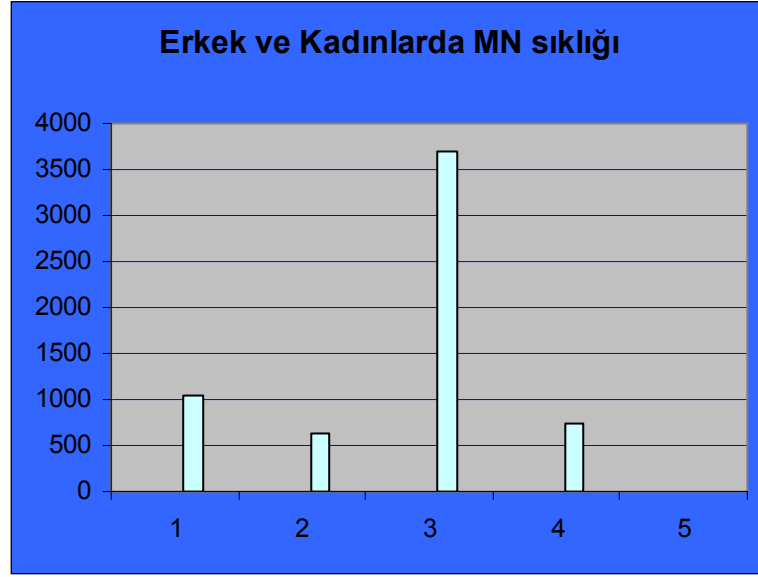
| Kontrol grubu | Genel Toplam | Kadın | Erkek |
|------------------------------------|---------------------|--------------|--------------|
| Mikronukleus sayısı | 1377 | 637 | 737 |
| Sayılan Toplam Hücre Sayısı | 106700 | 45100 | 61600 |

Tablo 7: Hasta Grubunda Mikronukleus Sayımı

| Kolorektal kanser grubu | Genel Toplam | Kadın | Erkek |
|------------------------------------|---------------------|--------------|--------------|
| Mikronukleus sayısı | 4750 | 1044 | 3706 |
| Sayılan Toplam Hücre Sayısı | 112178 | 32468 | 79710 |



Şekil 35: Kadın hasta, kadın kontrol grubu mn sıklığı ve erkek hasta, erkek kontrol grubu mn sıklığı karşılaştırma eğrisi



Şekil 36- Erkek ve Kadınlarda MN Sıklığı Grafiği:1.sütun: Kadın hasta mikronukleus sayısı,2.sütun: Kadın kontrol grubu, 3.sütun: Erkek hasta mikronukleus sayısı ,4.sütun: Erkek kontrol grubu. Erkek hastalarda mn sayısı, erkek kontrol grubunda Mann – Withney U testi ile ($p < 0.05$) anlamlı bulunmuştur.

Tablo 8: Mikronükleus(mn) sayımlarının istatistiki değerlendirilmesi

| İstatistik testi | | |
|------------------|--------------------------------|-------------------|
| cinsiyet | | mn |
| Erkek | Mann-Whitney U | 2,000 |
| | Wilcoxon W | 93,000 |
| | Z | -4,400 |
| | Asymp. Sig. (2-tailed) | ,000 |
| | Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,000 ^a |
| | | |
| kadın | Mann-Whitney U | 10,000 |
| | Wilcoxon W | 46,000 |
| | Z | -1,807 |
| | Asymp. Sig. (2-tailed) | ,071 |
| | Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | ,081 ^a |
| | | |

Mann Withney U testi (Mann Withney U testi, erkek grubu (kolorektal kanser erkek hasta sayısı = 15, kontrol erkek bireyler = 13) $p < 0.05$ olarak, kadın grubu(kolorektal kanser kadın hasta = 6, kontrol kadın bireyler = 8) $p > 0.05$ olarak bulunmuştur. Erkek hasta ve erkek kontrol grubu arasında mikronukleus oranları açısından fark anlamlıyken, kadın hasta grubu ve kontrol grubu arasındaki fark anlamlı değildir.

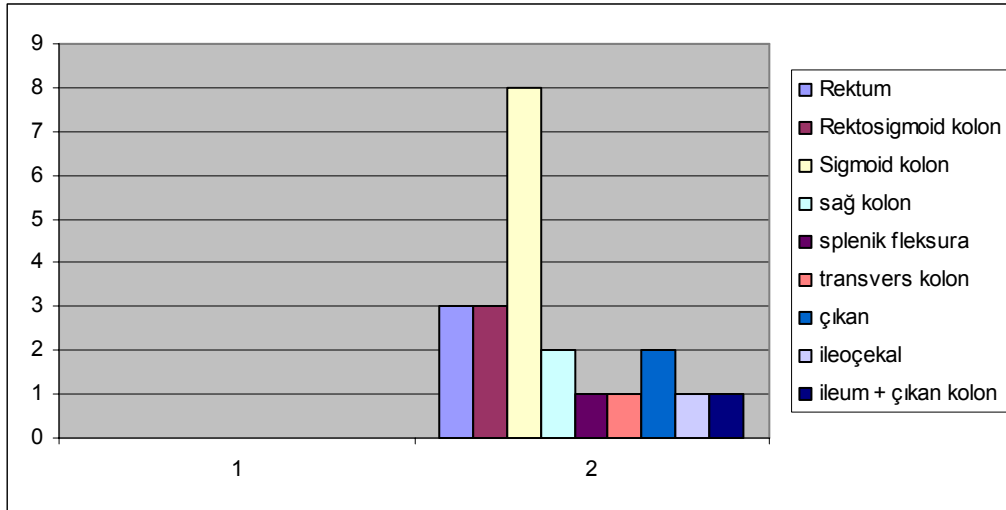
Tablo 9: Yaş ve mikronukleus korelasyon tablosu

| cinsiyet | | | yas | mn |
|----------|-----|------------------|---------|---------|
| Erkek | yas | Erkek korelasyon | 1 | ,764 ** |
| | | Sig. (2-tailed) | | ,000 |
| | | N | 28 | 28 |
| | mn | Erkek korelasyon | ,764 ** | 1 |
| | | Sig. (2-tailed) | ,000 | |
| | | N | 28 | 28 |
| kadın | yas | Kadın korelasyon | 1 | ,341 |
| | | Sig. (2-tailed) | | ,233 |
| | | N | 14 | 14 |
| | mn | Kadın korelasyon | ,341 | 1 |
| | | Sig. (2-tailed) | ,233 | |
| | | N | 14 | 14 |

Korelasyon tablosu: Erkekler için $r = 0,764$ $p < 0,05$, Kadınlar için $r = 0,341$ $p > 0,05$).

Erkeklerde yaş ve mikronukleus oranları arasında bir korelasyon vardır. Kadınlarda ise yaş ve mikronukleus oranları arasında korelasyon yoktur.

3-Patoloji raporları değerlendirilmesi



Şekil 37- Hastalarda kolorektal kanserin görüldüğü bölgelerin dağılım grafiği

Tablo 10 : Çalışmaya Alınan Hasta Grubu

| HASTA GRUBU(patoloji rapor sonuçlarına göre) | HASTA SAYISI |
|---|---------------------|
| Polip | 2 |
| Kronik kazeifiyeGranlamatöz iltihap(tbc) | 1 |
| Lenfoid hierplazi, lokalize peritonit | 1 |
| Akut appendisit, lokal peritonit | 1 |
| Kolorektal kanser | 18 |
| Kolorektal kanser ön tanısı ile ameliyata alınan hasta sayısı | 23 |

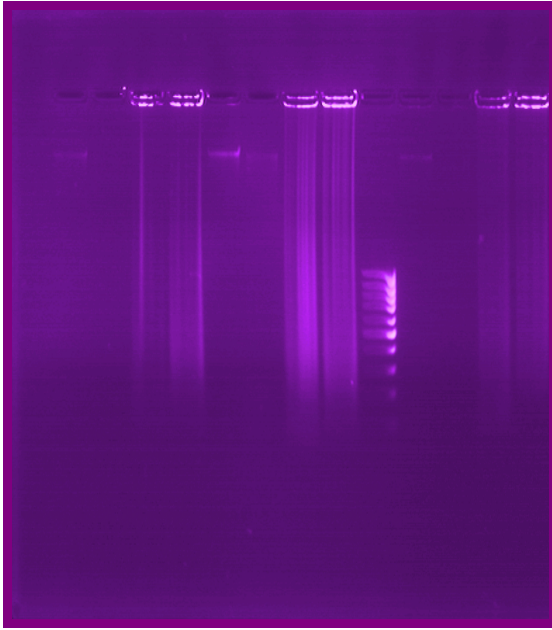
Tablo 11 : Aile Hikayesi ve Kanser İlişkisi

| Aile hikayesi | Hasta Sayısı |
|--|--|
| Ailede kolon kanseri hikayesi, otozomal dominant kalıtıma uyan | 2 |
| Ailede kolon kanseri ile diğer kanser öyküsü, Otozomal dominant kalıtıma uyan | 1 (kolon ca + seminom), 1 (kolon ca+ karaciğer ca) |
| Ailede başka kanser hikayesi | 2 (mesane ca, prostat ca) |
| Uzak akrabalarda şüpheli kolon kanser hikayesi | 2 |
| Akrabalarında Familyal Adenomatözis Polipozis Koli (FAP) hikayesi | 1 |
| Patoloji raporu ile kolorektal karsinom tanısı konmuş 18 hasta | Aile hikayesi kanser yönünden pozitif olan 8 hasta |

Metilasyona Spesifik Restriksiyon Enzim Kesim Profilleri

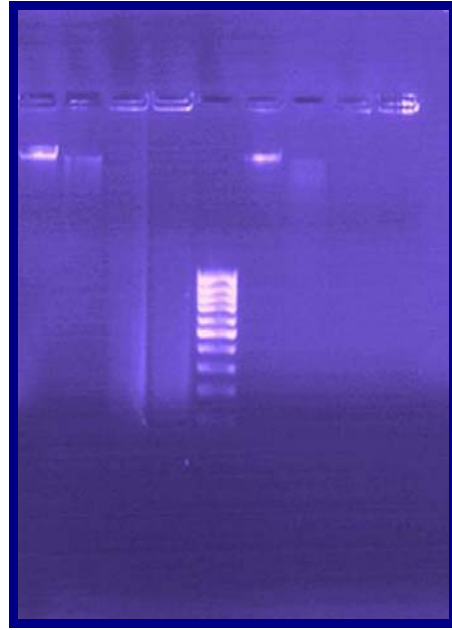
Hastalarımızın 24'ünde MspI ve HpaII restriksiyon enzimleri ile yapılan kesim farklılıklarının elektroforezdeki jel profilleri gösterilmiştir. Bu kesim etkileri yani kesim olup olmadığı ayrıca her hastada scion image gel plot görüntüleme sistemi ile değerlendirilip grafik haline getirilip yorumlanmıştır.

Jeller 4'lü gruplar halinde yüklenmiştir. 1. sıra kanDNA'sı, 2.sıra kan MspI enzim kesim, 3. sıra doku DNA'sı, 4. sıra doku DNA'sı MspI kesim olarak yüklenmiştir. Kesim arlıkları değerlendirilmek amacı ile 1000 bç'lik marker kullanılarak test edilmiştir. HpaII enzim için de uygulama aynı şekilde yapılmıştır. 1. sıra kanDNA'sı, 2.sıra kan HpaII enzim kesim, 3. sıra doku DNA'sı, 4. sıra doku DNA'sı HpaII kesim olarak yüklenmiştir.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Şekil 38- MspI kesim,1.jel, 1. bölüm



14 15 16 17 18 19 20 21 22

Şekil 39- MspI kesim,1.jel, 2.bölüm

1.bölüm

Sütun 1,2,3,4. Sütun 1: kan DNA'sı, Sütun 2: kan MspI ile kesim, Sütun 3: doku DNA'sı, Sütun4: doku MspI ile kesim. *1.hastaya ait*

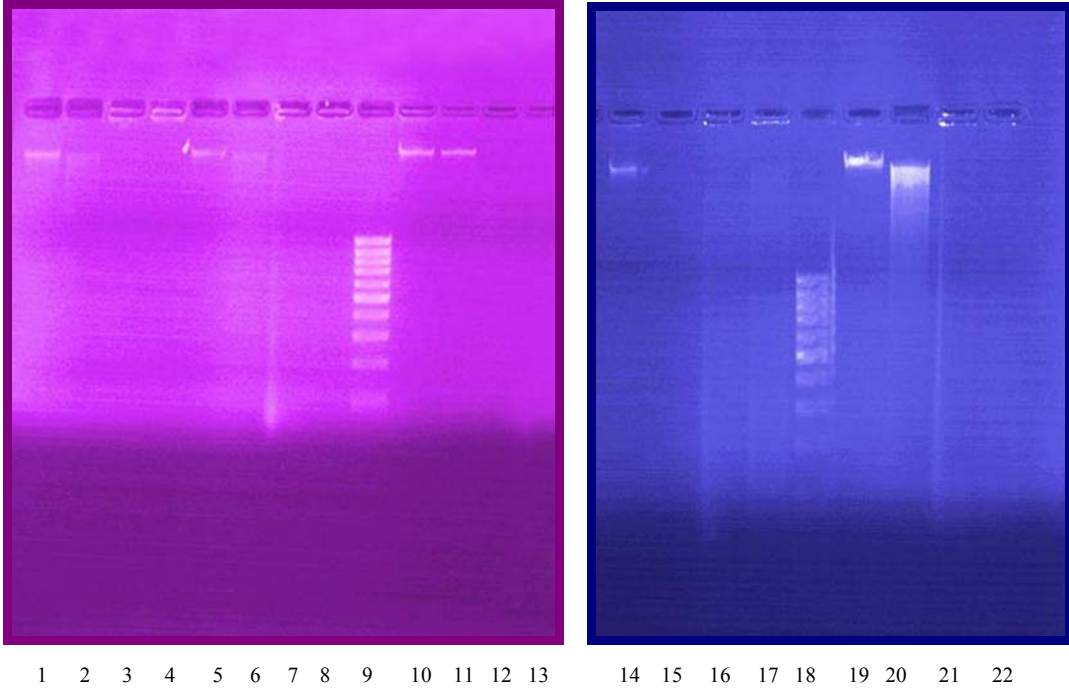
Sütun 5,6,7,8. Sütun 5: kan DNA'sı, Sütun 6: kan MspI ile kesim, Sütun 7: doku DNA'sı, Sütun 8 :doku MspI ile kesim. *2.hastaya ait*

Sütun 9,10,11,12,13. Sütun 9: marker, Sütun 10 : kan DNA'sı, Sütun 11 :kan MspI ile kesim, Sütun 12: doku DNA'sı, Sütun 13: doku MspI ile kesim. *3.hastaya ait*

2.bölüm.

Sütun 14,15,16,17. Sütun14 kan DNA'sı, Sütun 15: kan MspI ile kesim, Sütun 16: doku DNA'sı, Sütun 17: doku MspI ile kesim. *4.hastaya ait*

Sütun 18,19,20,21,22. Sütun18: marker, Sütun 19 : kan DNA'sı, Sütun 20 :kan MspI ile kesim, Sütun 21: doku DNA'sı, Sütun 22: doku MspI ile kesim. *5.hastaya ait*



Şekil 40- MspI kesim, 2.jel, 1.bölüm

Şekil 41- MspI kesim, 2.jel, 2.bölüm

1.bölüm

Sütun 1, 2, 3, 4. Sütun 1 kan DNA'sı, Sütun 2: kan MspI ile kesim, Sütun 3: doku DNA'sı, Sütun 4: doku MspI ile kesim. *6.hastaya ait*

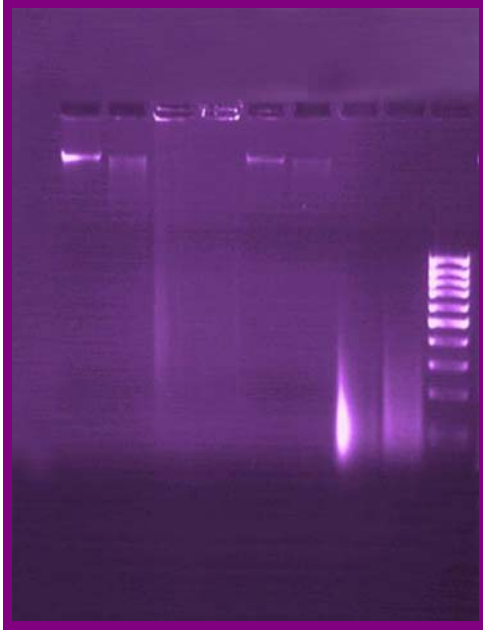
Sütun 5, 6, 7, 8. Sütun 5 kan DNA'sı, Sütun 6: kan MspI ile kesim, Sütun 7: doku DNA'sı, Sütun 8: doku MspI ile kesim. *7.hastaya ait*

Sütun 9,10,11,12,13. Sütun 9: marker, Sütun 10 : kan DNA'sı, Sütun 11: kan MspI ile kesim, Sütun 12: doku DNA'sı, Sütun 13: doku MspI ile kesim. *8.hastaya ait*

2.bölüm

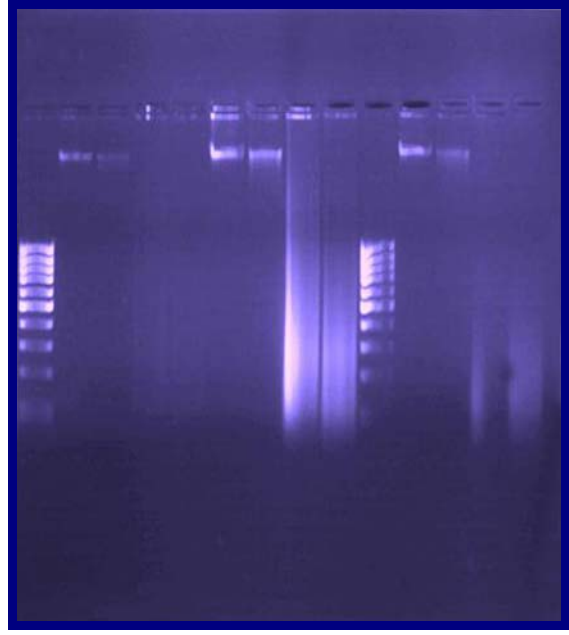
Sütun 14,15,16,17,18. Sütun14 : kan DNA'sı, Sütun 15: kan MspI ile kesim, Sütun 16: doku DNA'sı, Sütun 17: doku MspI ile kesim, Sütun 18: marker. *9.hastaya ait*

Sütun 19,20,21,22. Sütun 19 kan DNA'sı, Sütun 20: kan MspI ile kesim, Sütun 21: doku DNA'sı, Sütun 22: doku MspI ile kesim. *10. hastaya ait*



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Şekil 42- MspI kesim 3.jel, 1. bölüm



9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

Şekil 43- MspI kesim 3.jel, 2. bölüm

1. bölüm

Sütun 1, 2, 3, 4. Sütun 1 kan DNA'sı, Sütun 2: kan MspI ile kesim, Sütun 3: doku DNA'sı, Sütun 4: doku MspI ile kesim. *11. hastaya ait*

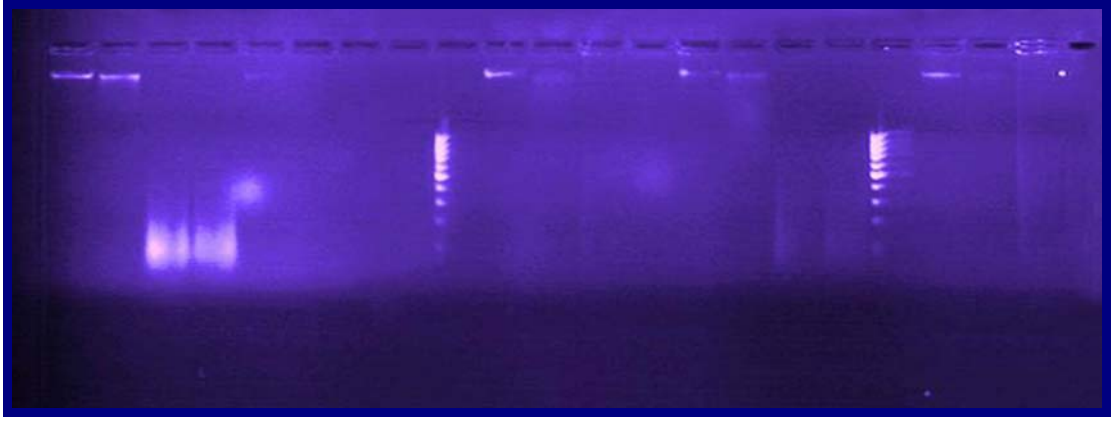
Sütun 5, 6, 7, 8, 9. Sütun 5: kan DNA'sı, Sütun 6: kan MspI ile kesim, Sütun 7: doku DNA'sı, Sütun 8: doku DNA'sı MspI ile kesim, Sütun 9: marker. *12.hastaya ait*

2.bölüm

Sütun 9, 10, 11, 12, 13. Sütun 9: marker, Line 10 : kan DNA'sı, line 11: kan MspI ile kesim, Line 12: doku DNA'sı, Line 13: doku MspI ile kesim. *13. hastaya ait*

Sütun 14, 15, 16, 17,18. Sütun 14 : kan DNA'sı, Sütun 15: kan MspI ile kesim, Sütun 16: doku DNA'sı, Sütun 17: doku MspI ile kesim, Sütun 18: marker. *14.hastaya ait*

Sütun 19, 20, 21, 22. Sütun19 : kan DNA'sı, Sütun 20: kan MspI ile kesim, Sütun 21: doku DNA'sı, Sütun 22: doku MspI ile kesim *15.hastaya ait.*



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

Şekil 44- MspI kesim, 4.jel

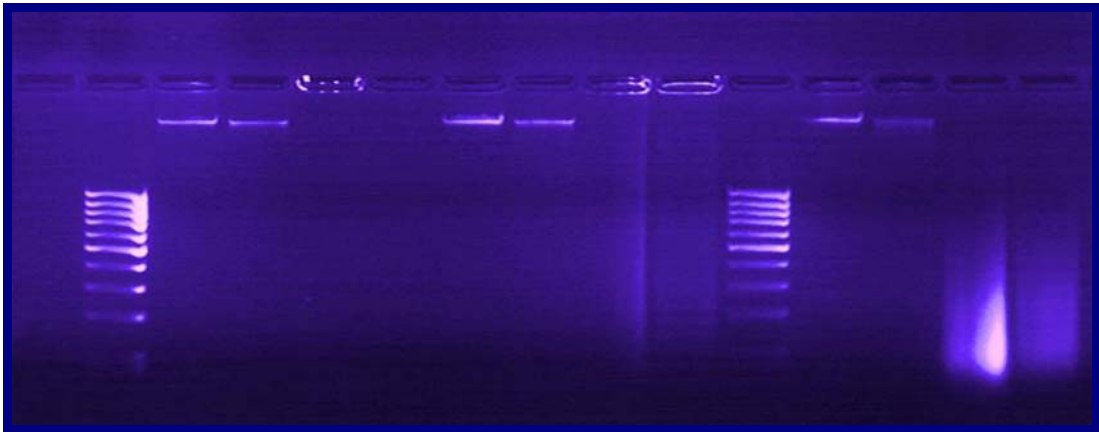
Sütun 1,2,3,4. Sütun 1: kan DNA'sı, Sütun 2: kan DNA'sı MspI ile kesim, Sütun 3: doku DNA'sı, Sütun 4: doku MspI ile kesim. *16.hastaya ait*

Sütun 5,6,7,8. Sütun 5: kan DNA'sı, Sütun 6: kan DNA'sı MspI ile kesim, Sütun 7: doku DNA'sı, Sütun 8: doku MspI ile kesim. *17.hastaya ait*

Sütun 9, 10, 11, 12, 13. Sütun 9: marker, Sütun 10: kan DNA'sı, Sütun 11: kan DNA'sı MspI ile kesim, Sütun 12: doku DNA'sı, Sütun 13: doku MspI ile kesim. *18.hastaya ait*

Sütun 14,15,16,17. Sütun 14: kan DNA'sı, Sütun 15: kan DNA'sı MspI ile kesim, Sütun 16: doku DNA'sı, Sütun 17: doku MspI ile kesim. *19.hastaya ait*

Sütun 18,19,20,21,22. Sütun 18: marker, Sütun 19: kan DNA'sı, Sütun 20: kan DNA'sı MspI ile kesim, Sütun 21: doku DNA'sı, Sütun 22: doku MspI ile kesim. *20.hastaya ait*



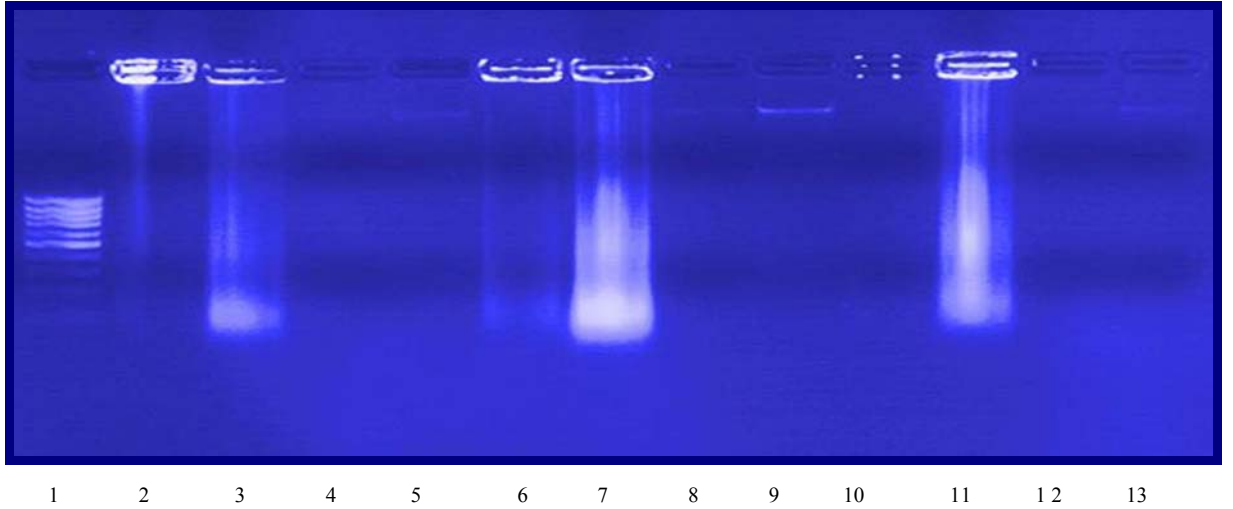
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Şekil 45- MspI kesim, 5.jel

Sütun 1,2,3,4,5. Sütun 1: Marker, Sütun 2: kan DNA'sı, Sütun 3: kan DNA'sı MspI ile kesim, Sütun 4: doku DNA'sı, Sütun 5: doku DNA'sı mspI ile kesim. *21.hastaya ait*

Sütun 6, 7, 8, 9, 10. Sütun 6: kan DNA'sı, Sütun 7: kan DNA'sı MspI ile kesim, Sütun 8: doku DNA'sı, Sütun 9: doku DNA'sı mspI ile kesim, Sütun 10: marker. *22.hastaya ait*

Sütun 11,12,13,14. Sütun 11: kan DNA'sı, Sütun 12: kan DNA'sı MspI ile kesim, Sütun 13: doku DNA'sı, Sütun 14: doku DNA'sı mspI ile kesim. *23.hastaya ait.*

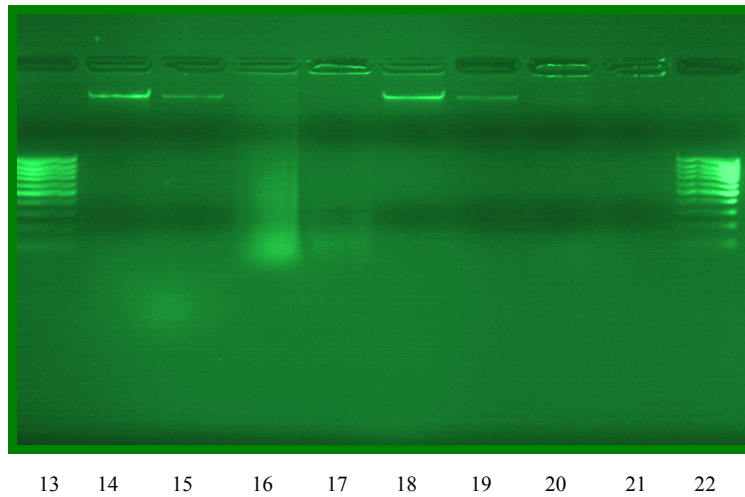


Şekil 46- HpaII kesim, 1.jel, 1. bölüm

Sütun 1.2.3.4.5. Sütun 1: marker, Sütun 2: kan DNA'sı, Sütun 3: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 4: doku DNA'sı Sütun 5: doku DNA'sı i HpaII ile kesim. *1.hastaya ait*

Sütun 6.7.8.9. Sütun 6: kan DNA'sı, Sütun 7: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 8: doku DNA'sı, Sütun 9: doku DNA'sı i HpaII ile kesim. *2.hastaya ait*

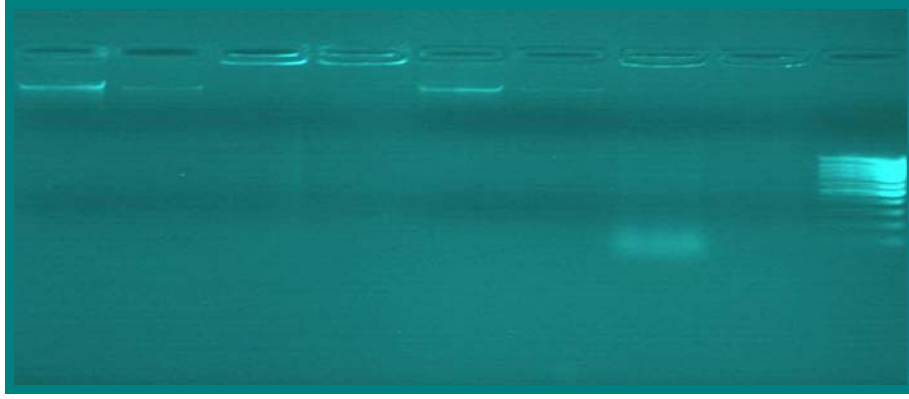
Sütun 10.11.12.13. Sütun 10: kan DNA'sı, Sütun 11: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 12: doku DNA'sı , Sütun 13: doku DNA'sı i HpaII ile kesim. *3.hastaya ait.*



Şekil 47-HpaII kesim, 1.jel, 2.bölüm

Sütun 13, 14,15,16,17. Sütun 13: marker, Sütun 14: kan DNA'sı, Sütun 15: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 16: doku DNA'sı , Sütun 17: doku DNA'sı i HpaII ile kesim. *4.hastaya ait.*

Sütun 18,19,20,21,22. Sütun 18: kan DNA'sı, Sütun 19: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 20: doku DNA'sı, Sütun 21: doku DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 22: marker. *5.hastaya ait*

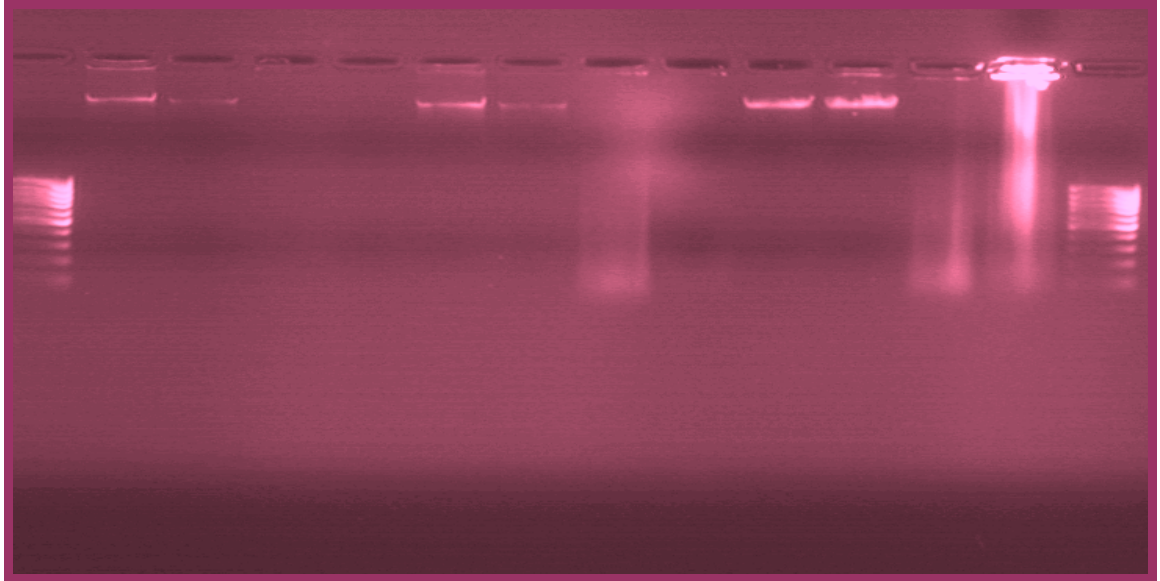


1 2 3 4 5 6 7 8 9

Şekil 48- HpaII kesim, 2.jel, 1. bölüm

Sütun 1, 2, 3, 4. Sütun 1: kan DNA'sı, Sütun 2: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 3: doku DNA'sı, Sütun 4: doku DNA'sı ile HpaII kesim. *6.hastaya ait*

Sütun 5, 6, 7, 8, 9. Sütun 5: kan DNA'sı, Sütun 6: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 7 : doku DNA'sı , Sütun 8: doku DNA'sı i HpaII ile kesim, Sütun 9: marker. *7.hastaya ait*



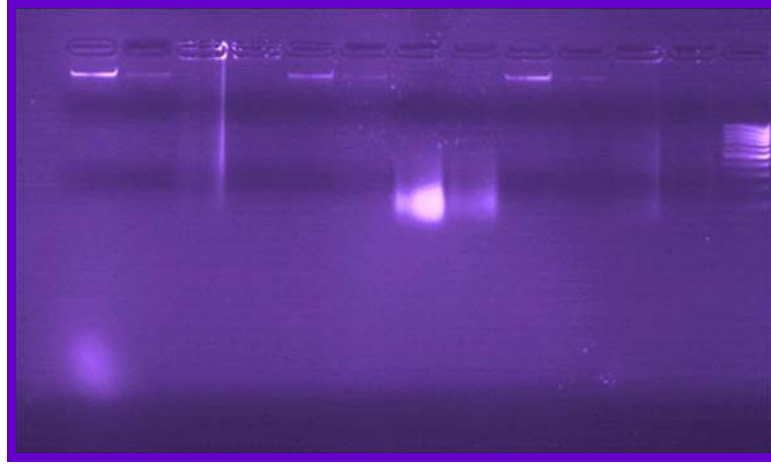
9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

Şekil 49- HpaII kesim, 2.jel, 2. bölüm

Sütun 9,10,11,12,13. Sütun 9: marker, Sütun 10: kan DNA'sı, Sütun 11: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 12: doku DNA'sı , Sütun 13: doku DNA'sı HpaII ile kesim. *8.hastaya ait*

Sütun 14,15,16,17. Sütun 14: kan DNA'sı, Sütun 15: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 16 : doku DNA'sı , Sütun 17: doku DNA'sı HpaII ile kesim. *9.hastaya ait*

Sütun 18,19,20,21,22. Sütun 18: kan DNA'sı, Sütun 19: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 20 : doku DNA'sı , Sütun 21: doku DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 22: marker. *10.hastaya ait.*



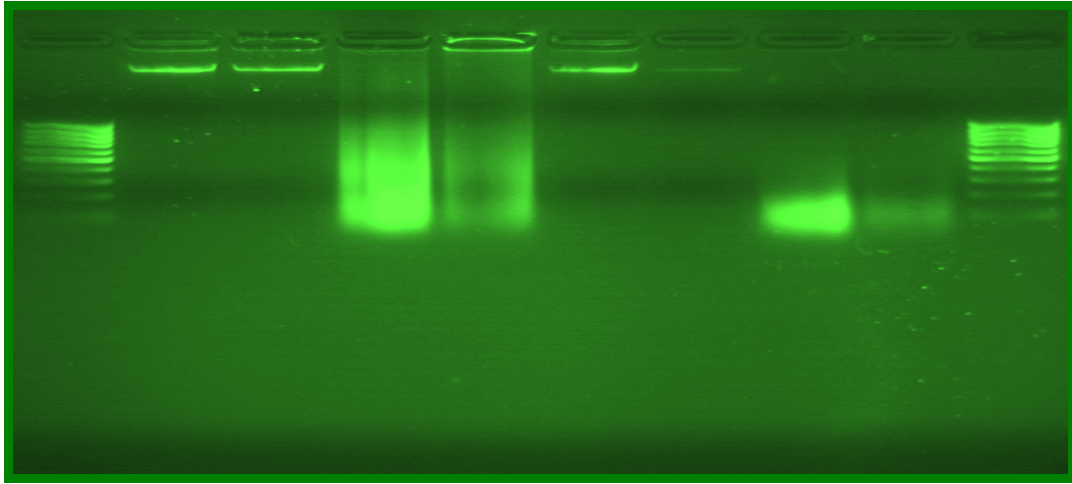
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Şekil 50- HpaII kesim, 3.jel, 1. bölüm

Sütun 1,2,3,4. Sütun 1: kan DNA'sı, Sütun 2: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 3: doku DNA'sı , Sütun 4: doku DNA'sı HpaII ile kesim. *11.hastaya ait*

Sütun 5,6,7,8. Sütun 5: kan DNA'sı, Sütun 6: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 7: doku DNA'sı , Sütun 8: doku DNA'sı HpaII ile kesim. *12.hastaya ait*

Sütun 9,10,11,12,13. Sütun 9: kan DNA'sı, Sütun 10: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 11: doku DNA'sı , Sütun 12: doku DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 13: marker. *13.hastaya ait.*

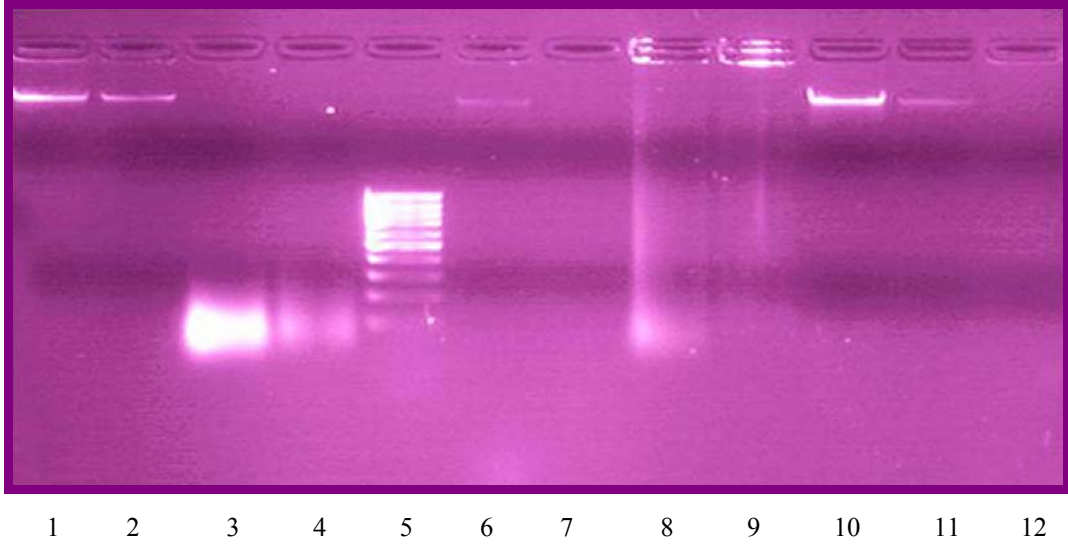


13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

Şekil 51-HpaII kesim, 3. jel, 2. bölüm

Sütun13,14,15,16,17. Sütun 13: marker, Sütun 14: kan DNA'sı, Sütun 15: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 16: doku DNA'sı, Sütun 17: doku DNA'sı HpaII ile kesim. *14.hastaya ait*

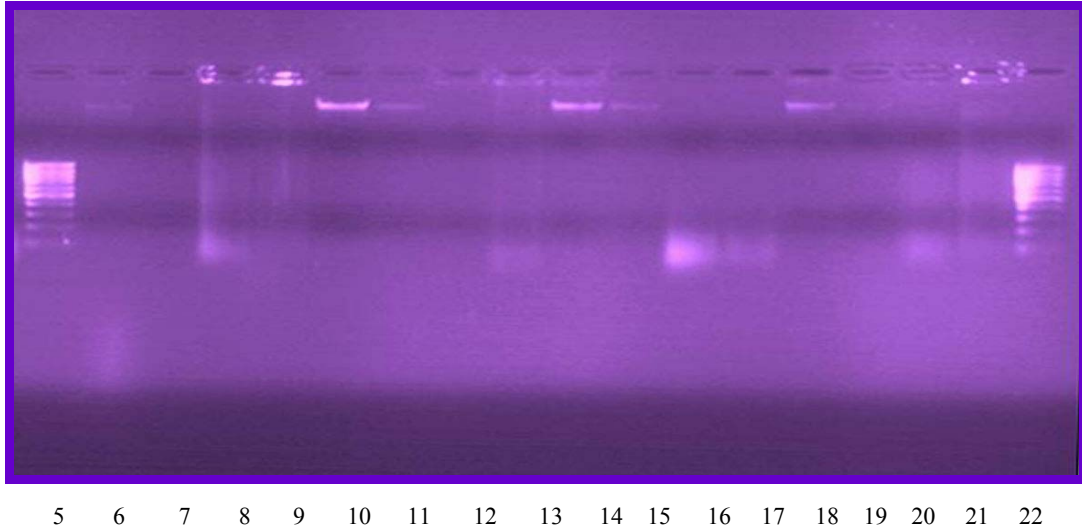
Sütun 18,19,20,21,22. Sütun 18: kan DNA'sı, Sütun 19: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 20: doku DNA'sı, Sütun 21: doku DNA'sı HpaII ile kesim. *15.hastaya ait*



Şekil 52- HpaII kesim, 4.jel, 1. bölüm

Sütun 1,2,3,4,5. Sütun 1: kan DNA'sı, Sütun 2: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 3: doku DNA'sı, Sütun 4: doku DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 5:marker. *16.hastaya ait*

Sütun 6,7,8,9. Sütun 6: kan DNA'sı, Sütun 7: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 8: doku DNA'sı , Sütun 9: doku DNA'sı HpaII ile kesim. *17.hastaya ait.*

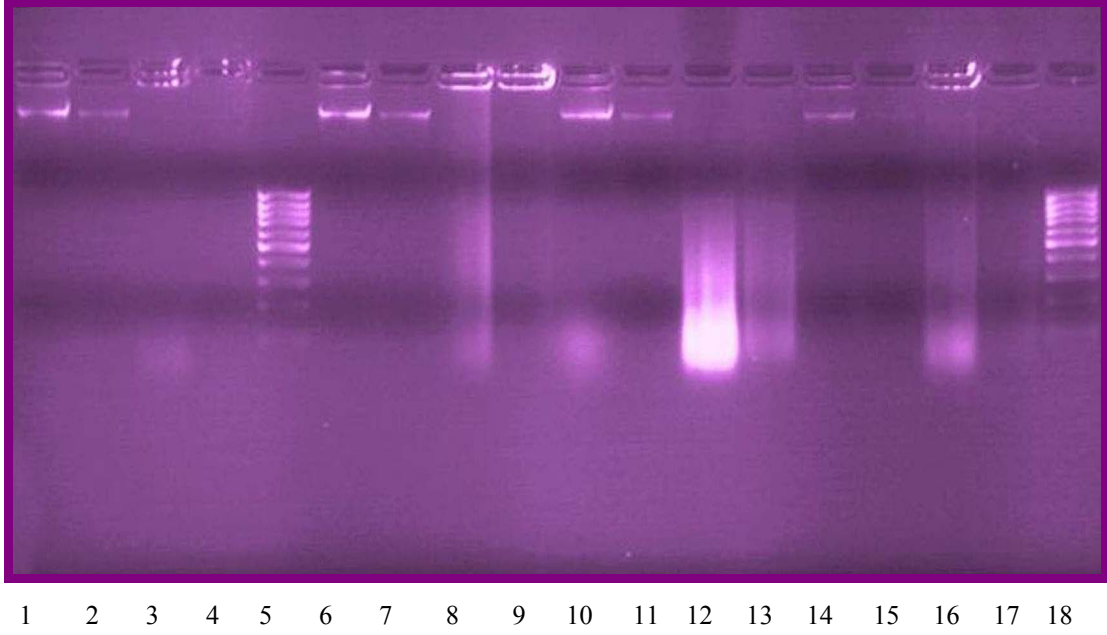


Şekil 53- HpaII kesim, 4.jel, 2.bölüm

Sütun 10,11,12,13. Sütun 10: kan DNA'sı, Sütun 11: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 12: doku DNA'sı , Sütun 13: doku DNA'sı HpaII ile kesim. *18.hastaya ait*

Sütun 14,15,16,17. Sütun 14: kan DNA'sı, Sütun 15: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 16: doku DNA'sı , Sütun 17: doku DNA'sı HpaII ile kesim. *19.hastaya ait*

Sütun 18,19,20,21,22. Sütun 18: kan DNA'sı, Sütun 19: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 20: doku DNA'sı, Sütun 21: doku DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 22: marker. *20.hastaya ait.*



Şekil 54- HpaII kesim, 5. jel

Sütun 1, 2, 3, 4, 5. Sütun 1: kan DNA'sı, Sütun 2: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 3: doku DNA'sı , Sütun 4: doku DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 5:marker. *21.hastaya ait*

Sütun 6, 7, 8, 9. Sütun 6: kan DNA'sı, Sütun 7: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 8: doku DNA'sı , Sütun 9: doku DNA'sı HpaII ile kesim. *22.hastaya ait*

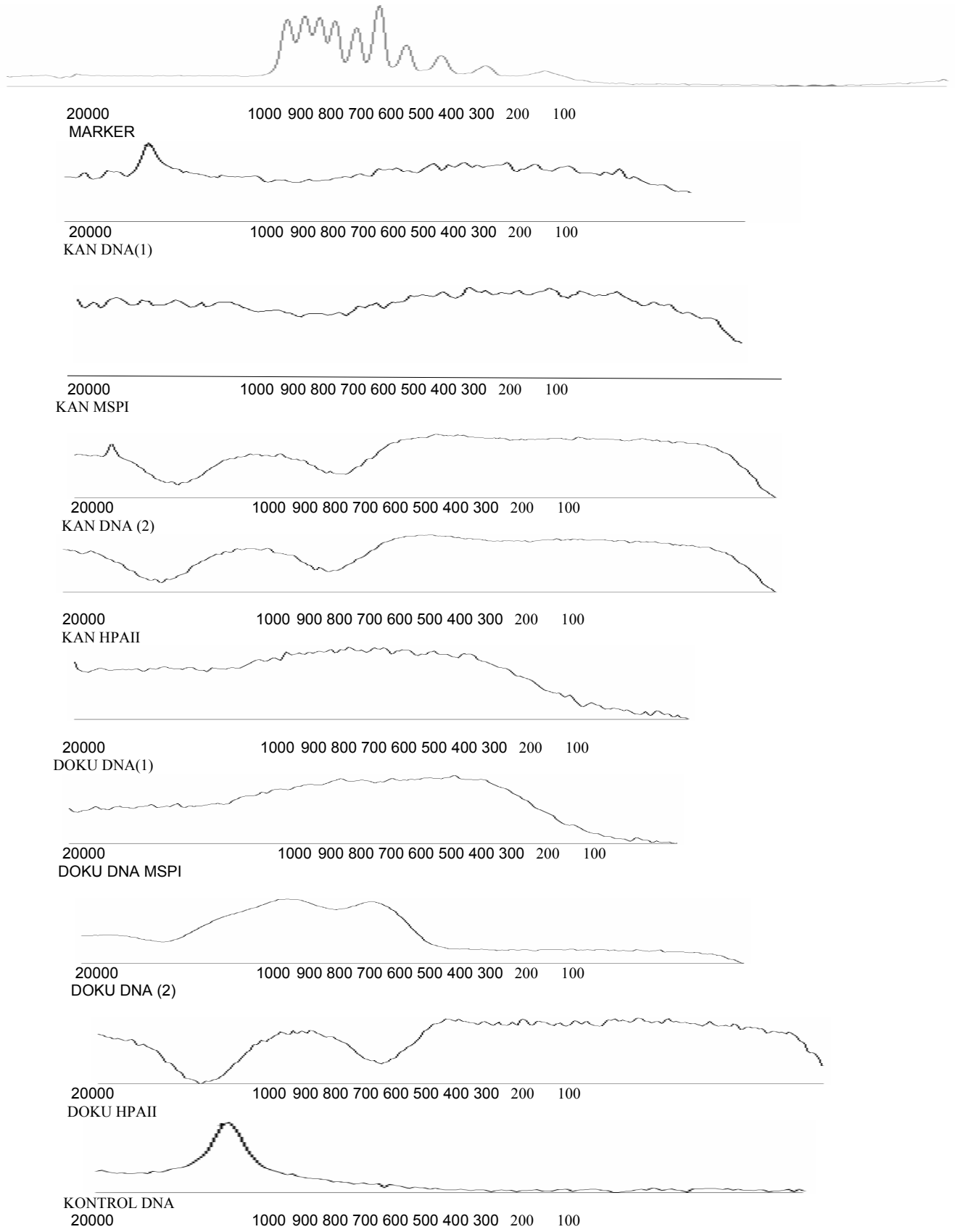
Sütun 10, 11, 12, 13. Sütun 10: kan DNA'sı, Sütun 11: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 12: doku DNA'sı , Sütun 13: doku DNA'sı HpaII ile kesim. *23.hastaya ait*

Not: Sütun 14, 15, 16, 17, 18 . Sütun 14: kan DNA'sı, Sütun 15: kan DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 16: doku DNA'sı, Sütun 17: doku DNA'sı HpaII ile kesim, Sütun 18: marker. *24.hasta(kan mspI kesimi yok, o nedenle değerlendirilmedi).*

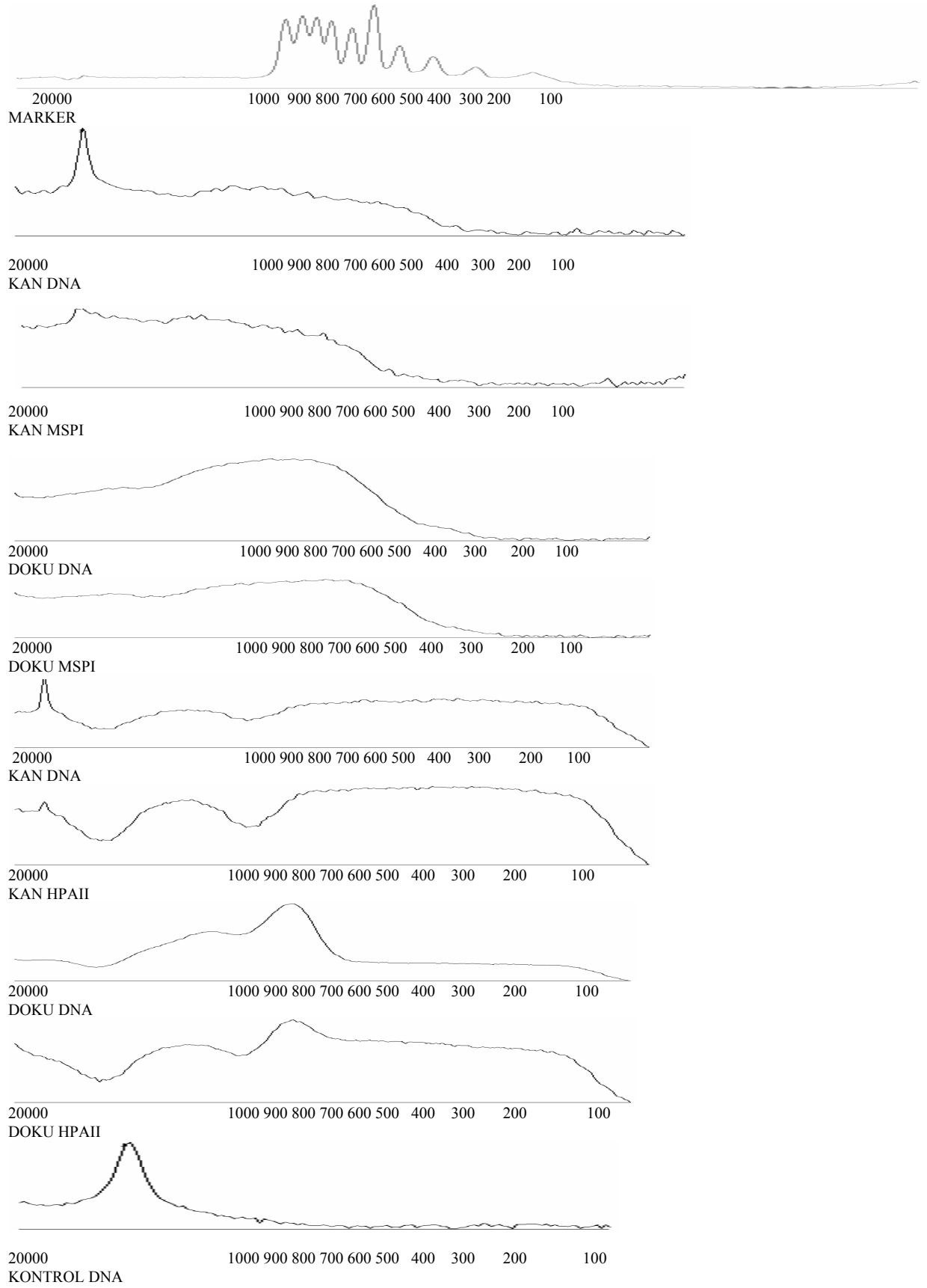
Tablo 12: MspI ve HpaII kesimlerinin kolorektal kanser tipleri ile olan ilişkisi

| NO | C | yaş | Kan MspI | Kan HpaII | Doku MspI | Doku HpaII | TANI | Lenf nodu | Uzak metas taz |
|----|---|-----|----------|-----------|-----------|------------|--------------------------------|----------------|----------------|
| 1 | K | 68 | + | + | + | ++ | Müsinöz ca. Orta derece dif. | N ₂ | - |
| 2 | E | 77 | + | + | ++ | ++ | Adenokarsinom Grade 2 | N ₁ | - |
| 3 | K | 65 | + | + | + | ++ | Adenokarsinom NOS. Grade 2 | N ₁ | - |
| 4 | K | 70 | + | ++ | + | ++ | Adenokarsinom Grade 2 | N ₀ | - |
| 5 | K | 26 | ++ | ++ | + | - | Müsinöz adeno ca. | N ₂ | - |
| 6 | E | 59 | + | ++ | + | - | Polip | - | - |
| 7 | E | 64 | + | + | + | + | Lenfoid hiperplazi | - | - |
| 8 | E | 62 | + | + | + | + | Adenokarsinom Müsinöz tip | N ₁ | - |
| 9 | K | 60 | + | + | + | + | Adenokarsinom NOS,orta dif | N ₀ | - |
| 10 | E | 52 | + | - | + | ++ | Adenokarsinom Grade 2 | N ₀ | - |
| 11 | E | 49 | + | ++ | + | ++ | Adenomüsinöz karsinom grade 2 | N ₂ | + |
| 12 | E | 70 | + | + | + | ++ | Adenokarsinom NOS | N ₀ | + |
| 13 | E | 37 | + | ++ | + | - | İnflamatuar polip | - | - |
| 14 | E | 54 | + | - | + | + | Adenomüsinöz karsinom grade2 | N ₀ | - |
| 15 | E | 52 | + | ++ | + | ++ | Adenokarsinom Grade 2 orta dif | N ₂ | - |
| 16 | E | 58 | + | ++ | + | ++ | Adenokarsinom Grade 2 | N ₁ | - |
| 17 | E | 29 | + | + | + | ++ | Müsinöz adenoca. Orta dif | N ₂ | - |
| | | | | | | | | | |

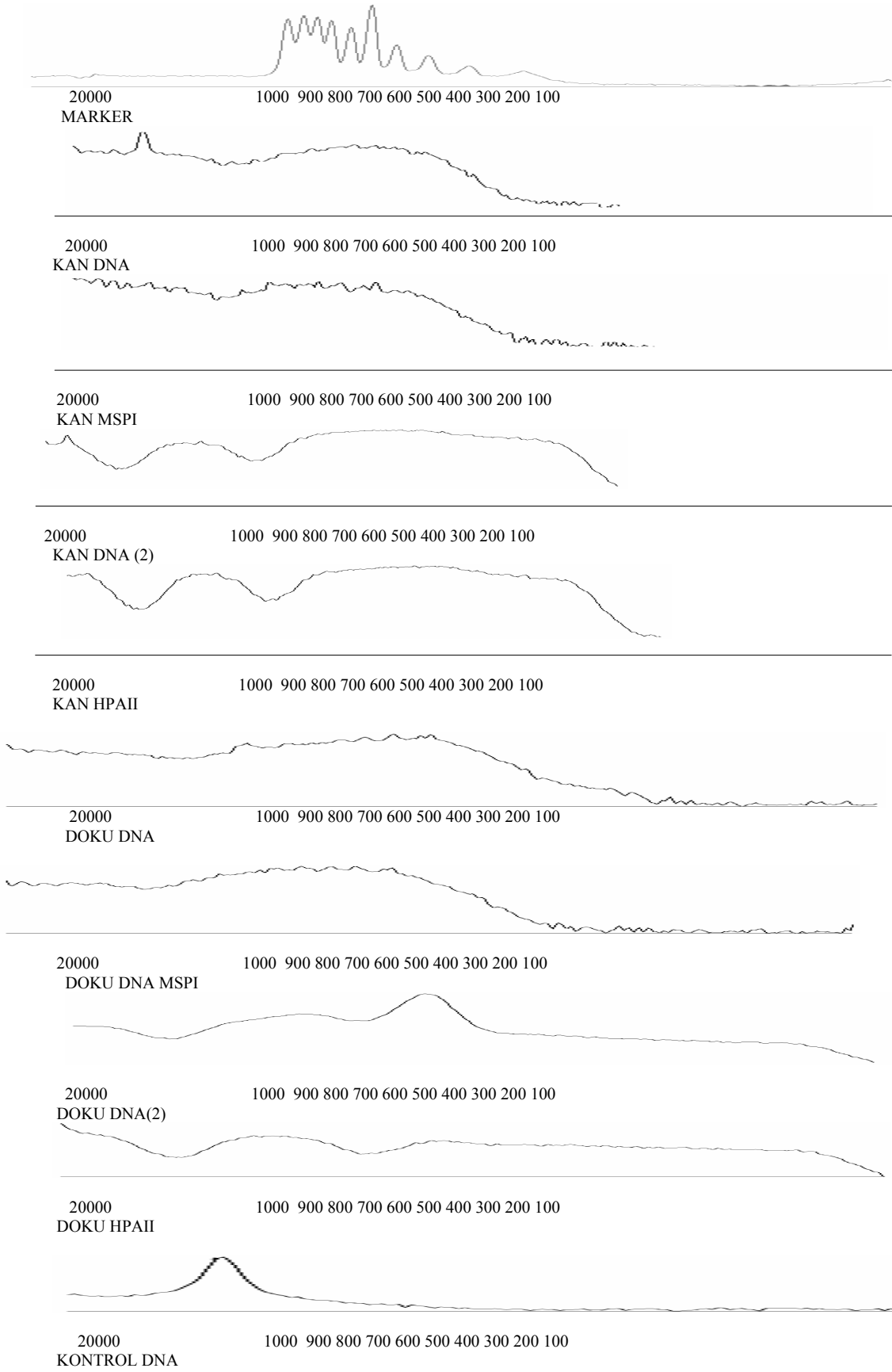
| | | | | | | | | | |
|----|---|----|----|----|---|----|----------------------------|-----------------|---|
| 18 | K | 73 | + | + | + | ++ | Adenokarsinom Grade 2 | sN ₀ | + |
| 19 | K | 70 | + | + | + | ++ | Kazeifiye granilamatöz | - | - |
| 20 | K | 26 | + | + | + | - | Müsinöz adenokarsinom | N ₂ | - |
| 21 | E | 70 | + | + | + | + | Lokal peritonit | - | - |
| 22 | E | 70 | + | + | + | ++ | Müsinöz adenoca | N ₂ | |
| 23 | E | 73 | ++ | ++ | + | ++ | Adenokarsinom orta dif. | No | |



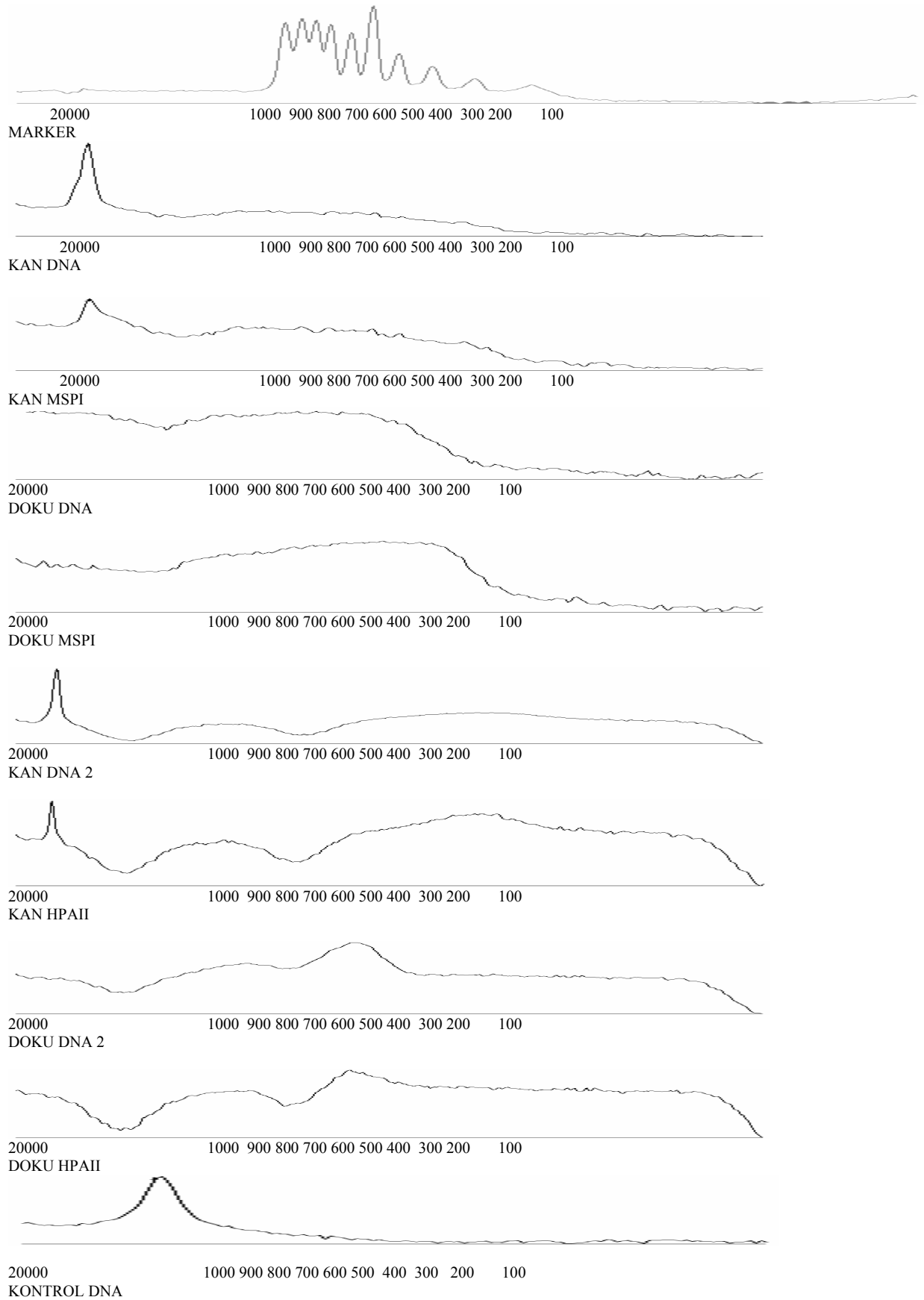
Şekil 55 - 1. Hasta, Müsinöz Adenokarsinom, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



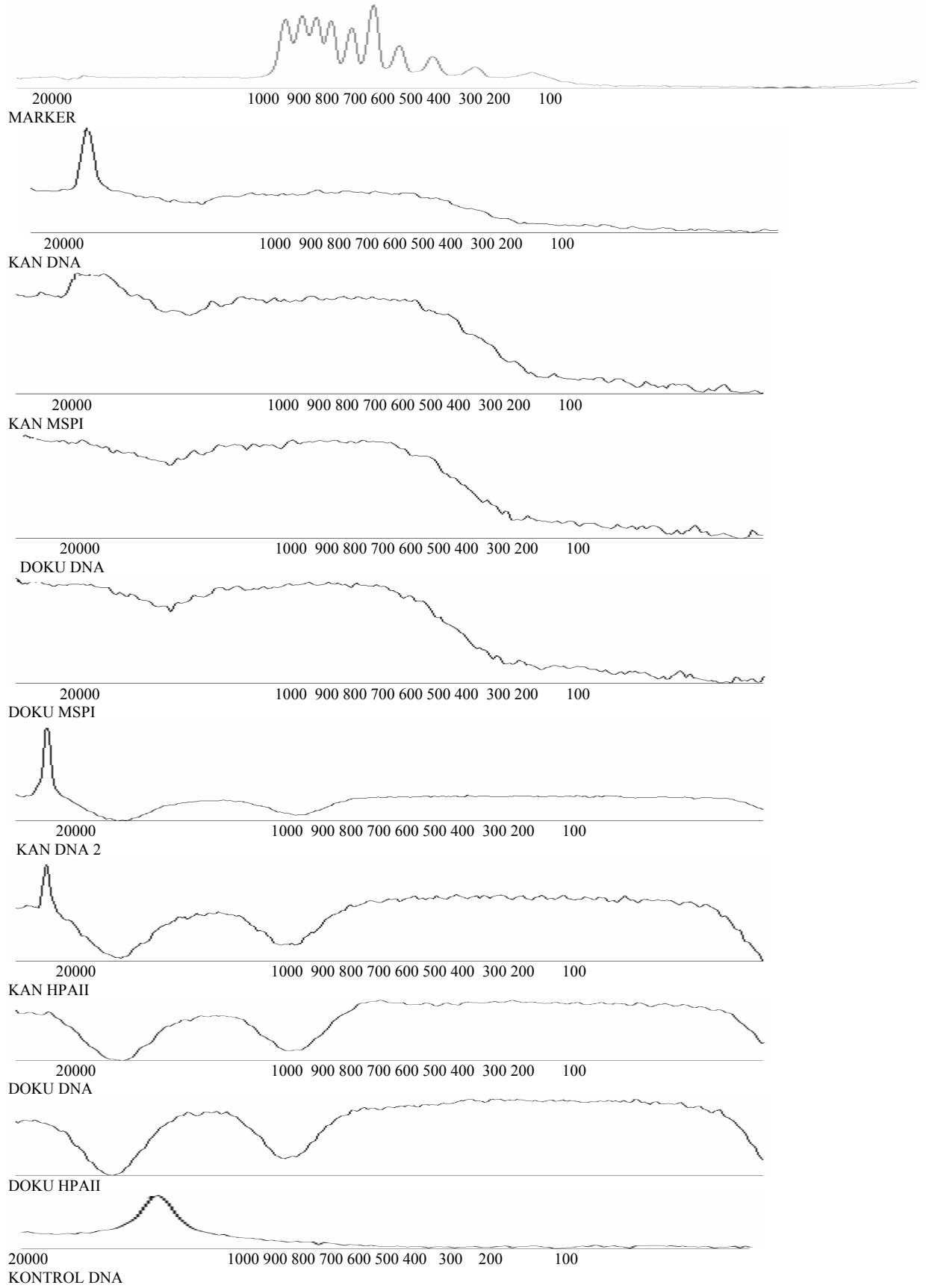
Şekil 56 - 2. Hasta, Adenokarsinom Grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



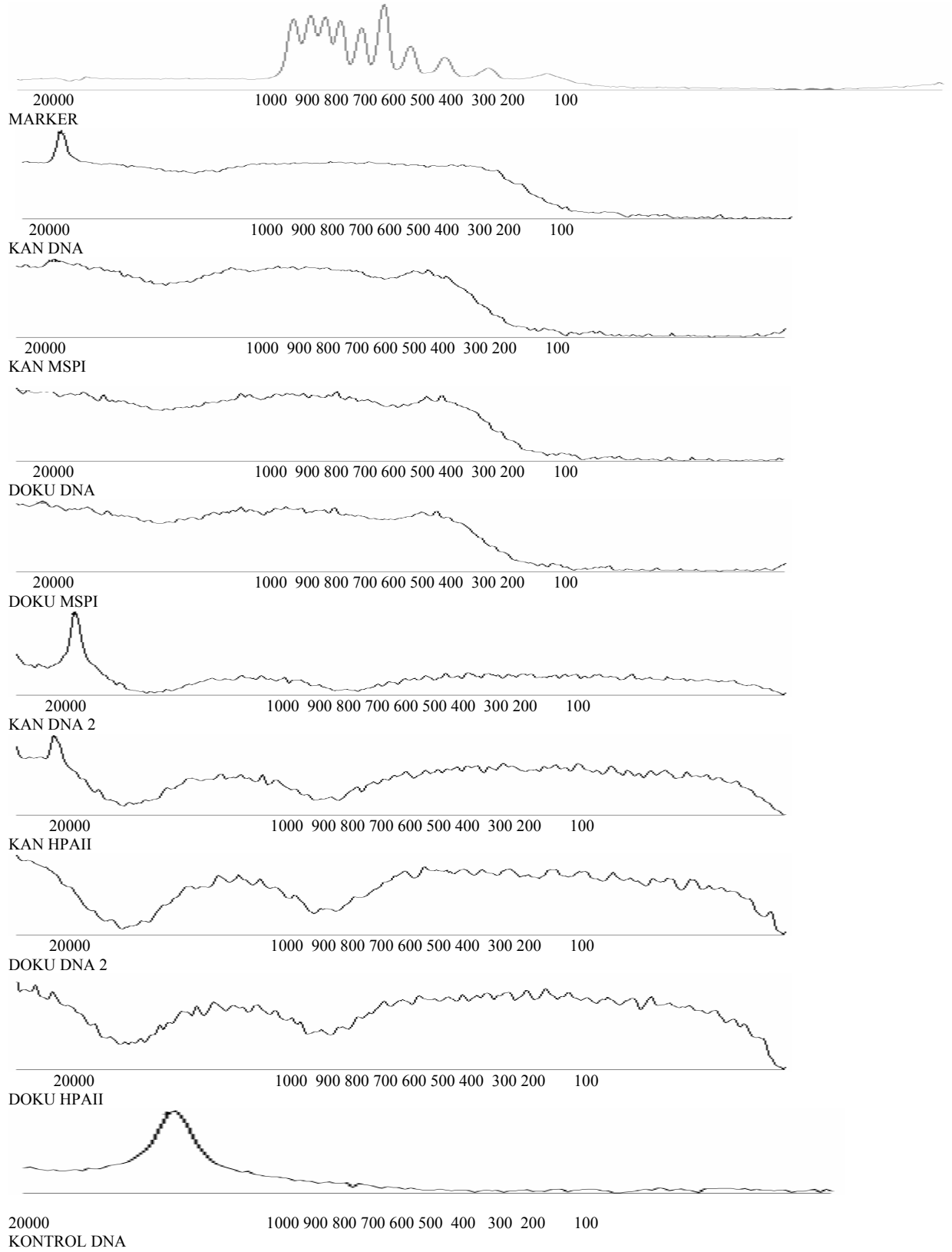
Şekil 57 - 3. Hasta, Adenokarsinom Grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



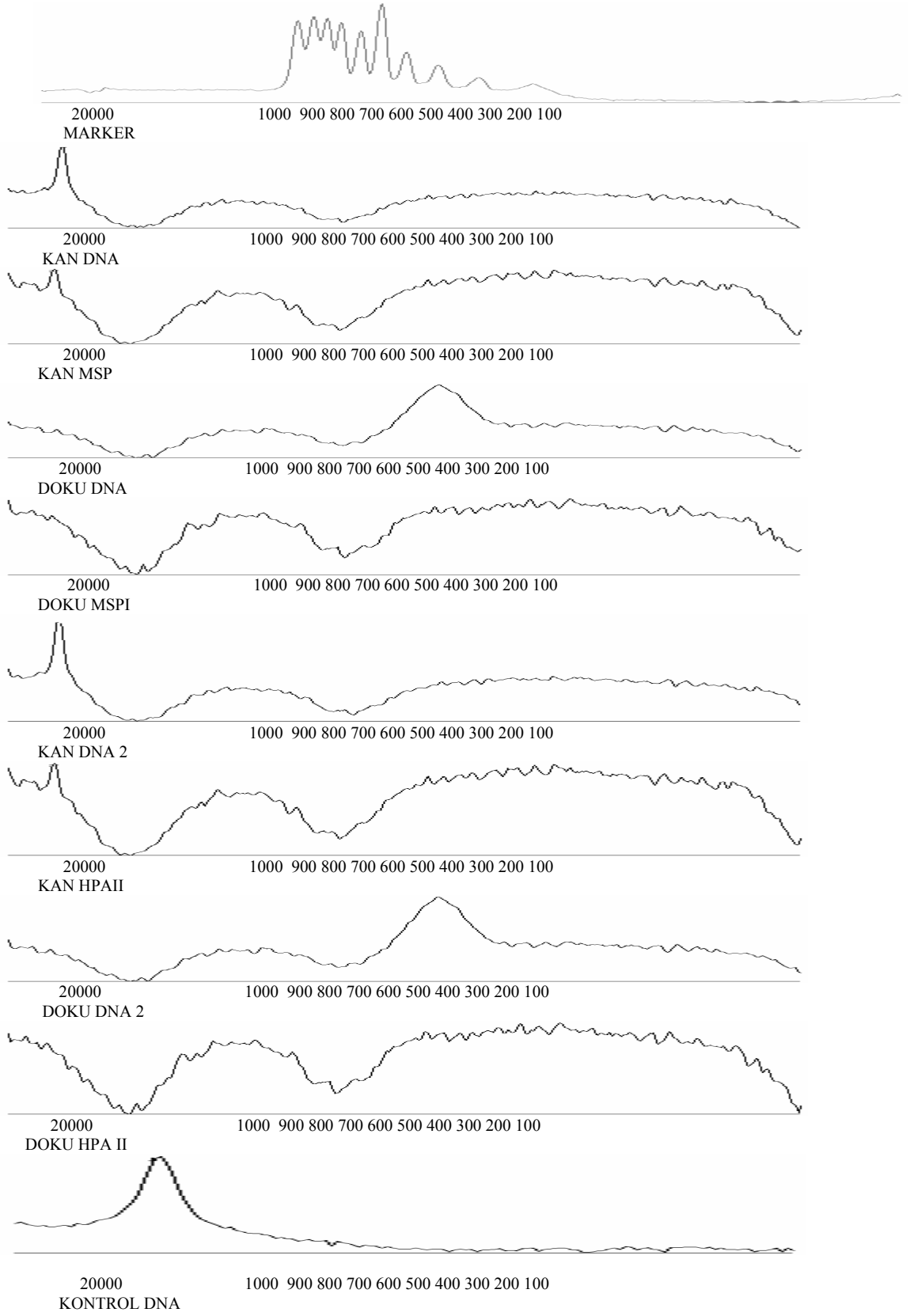
Şekil 58 - 4. Hasta, Adenokarsinom Grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



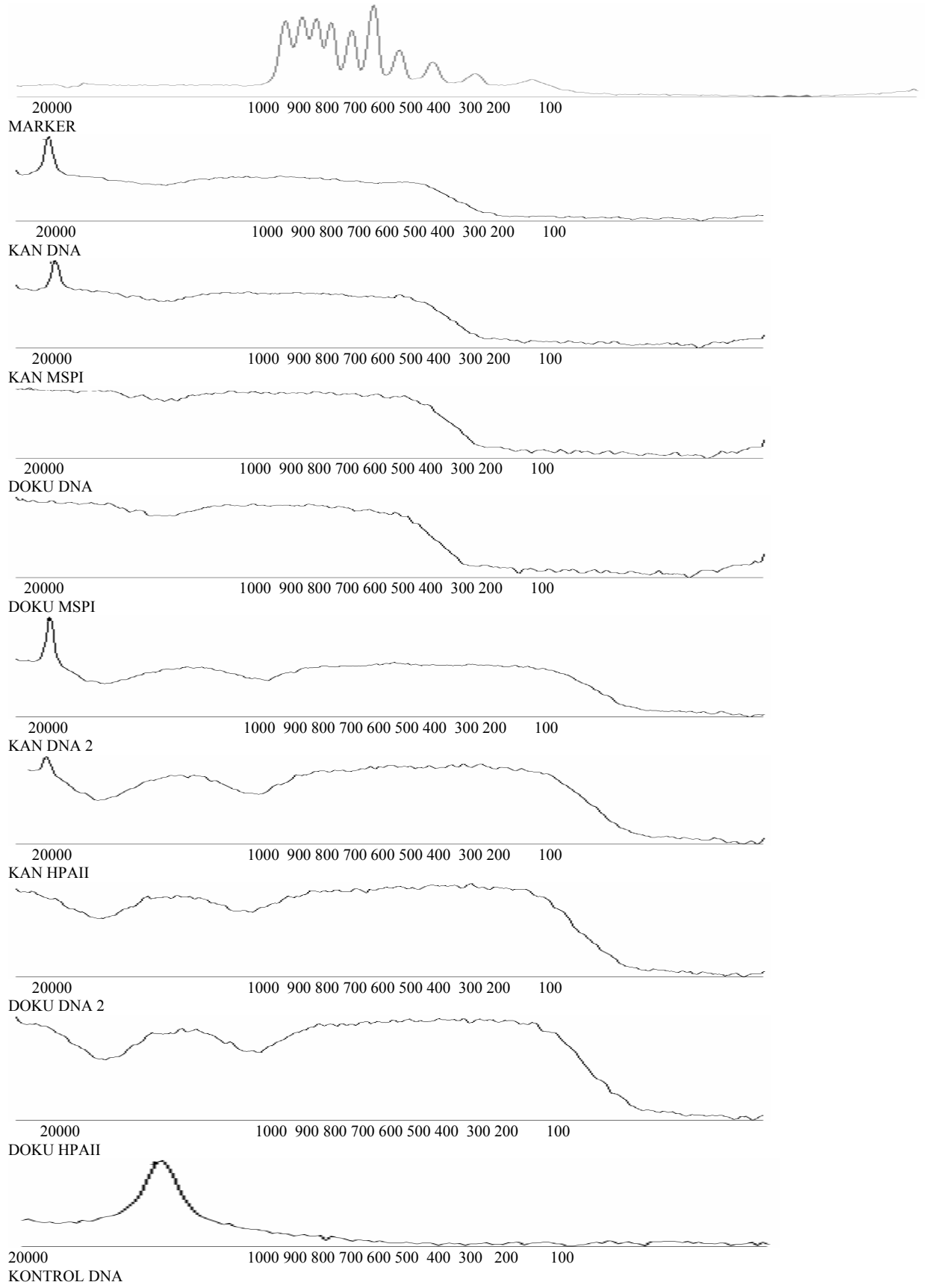
Şekil 59 - 5. Hasta, Müsinöz adenokarsinom Grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



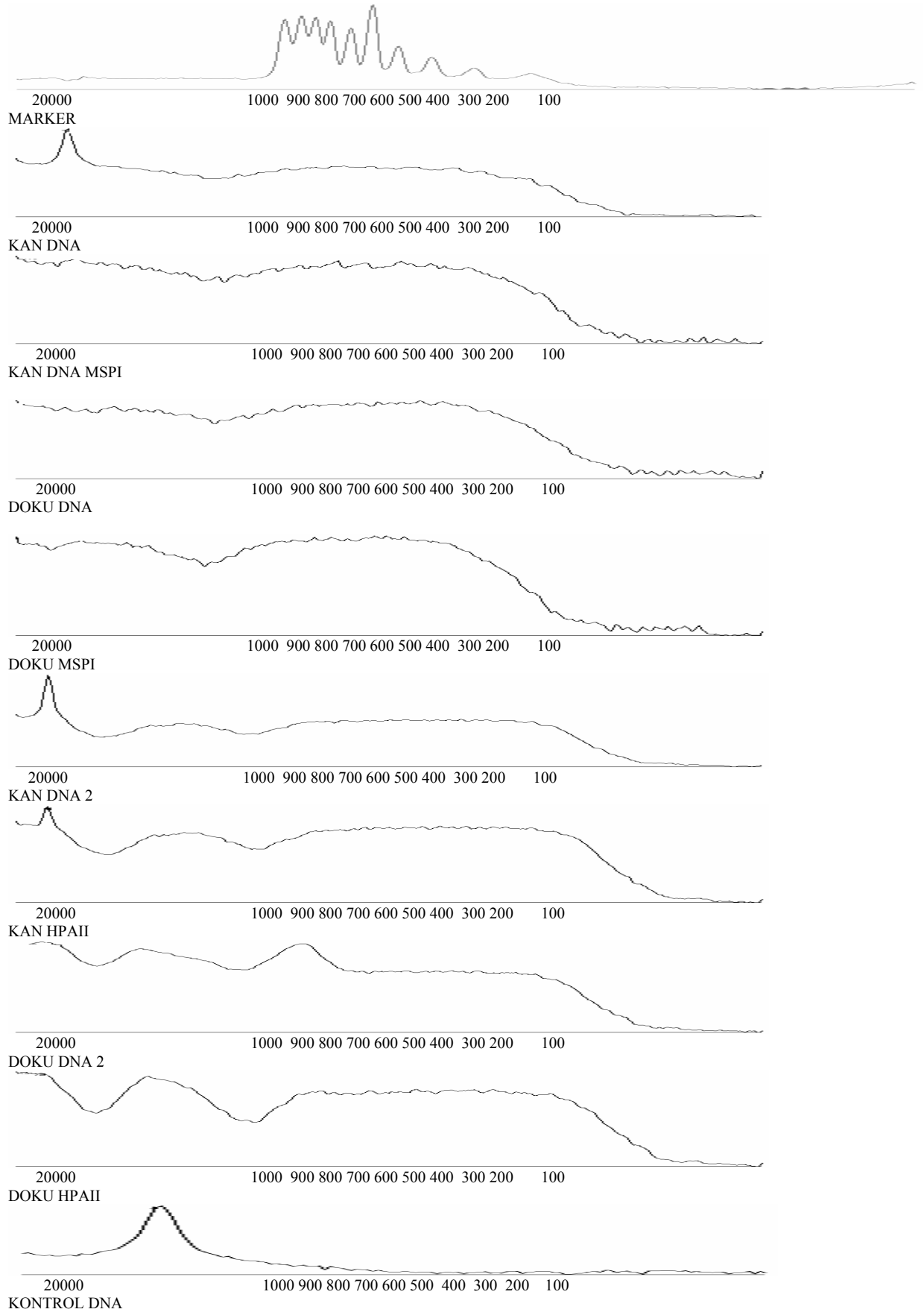
Şekil 60 - 6. Hasta, Polip, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



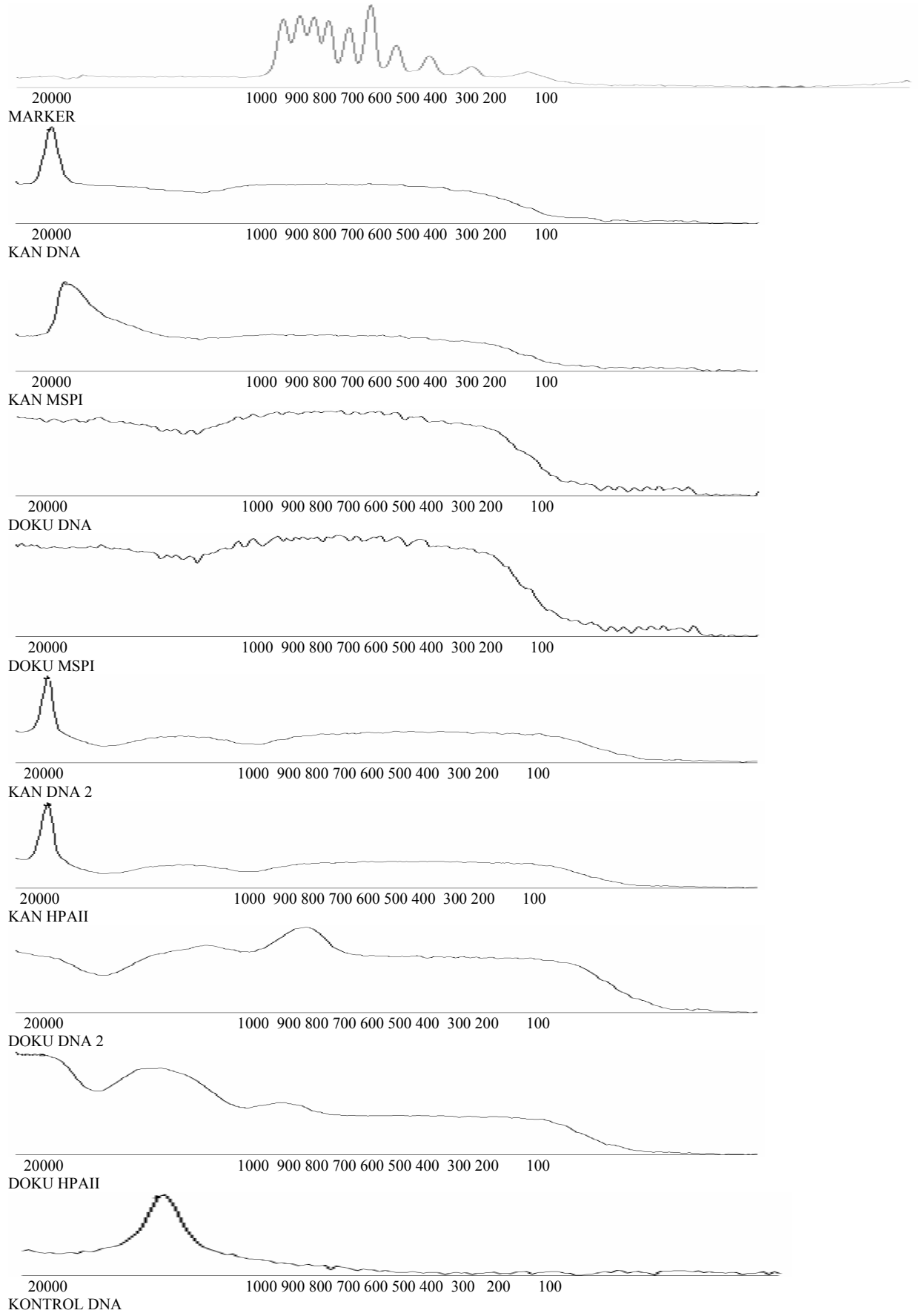
Şekil 61 - 7. Hasta, Lenfoid hiperplazi, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



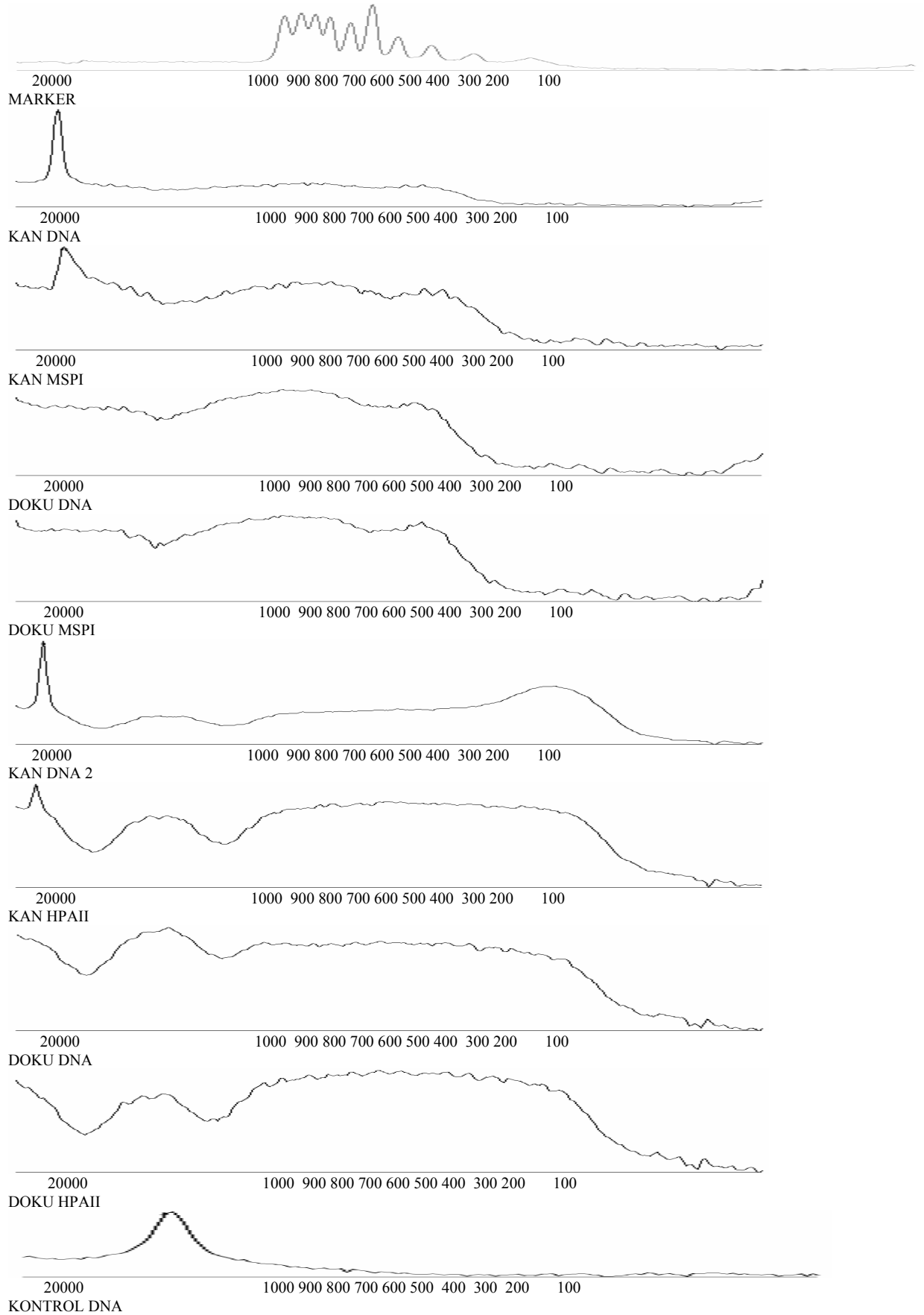
Şekil 62 - 8. Hasta, Adenokarsinom müsinöz tip, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



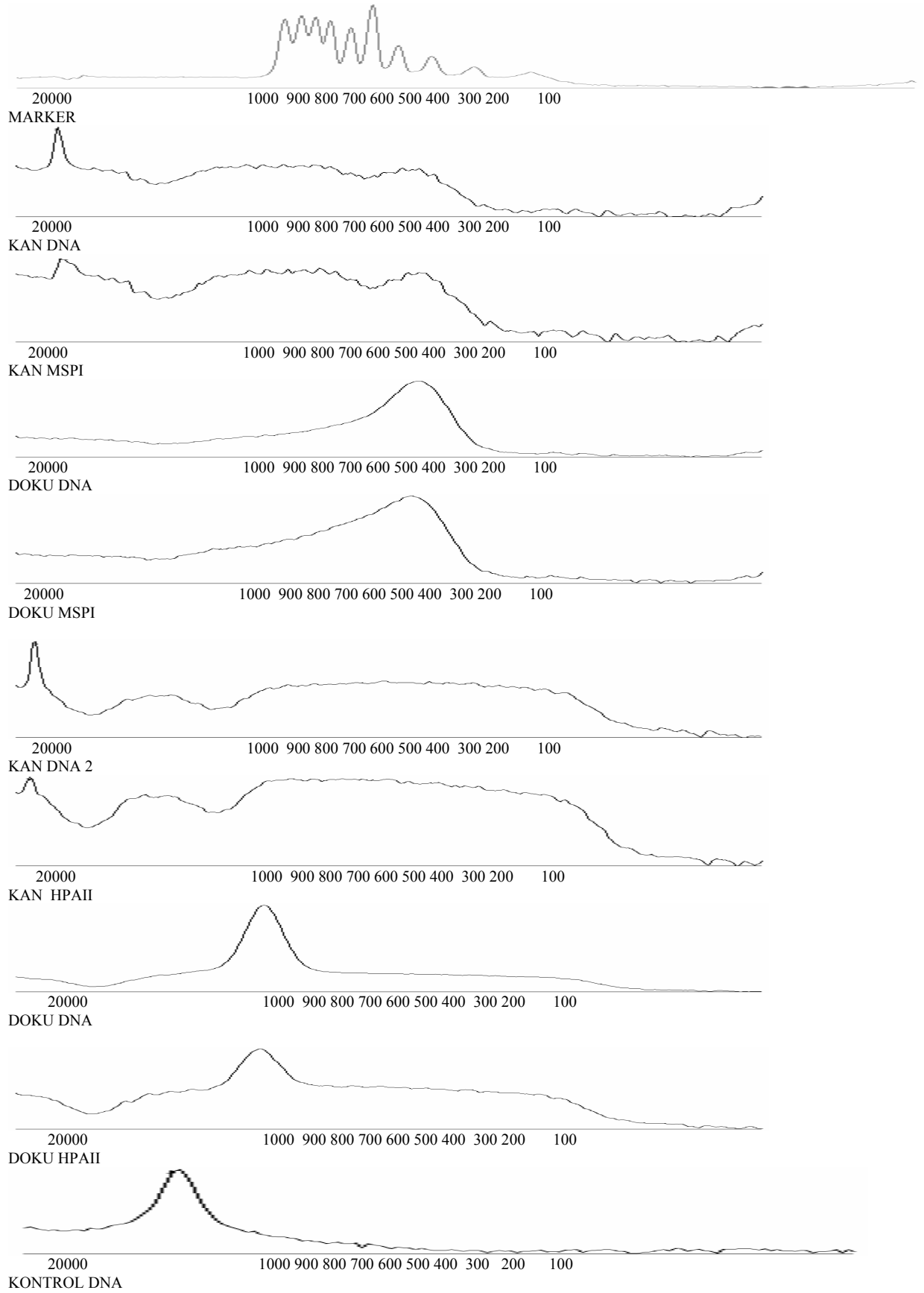
Şekil 63 - 9. Hasta, Adenokarsinom orta dif., MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



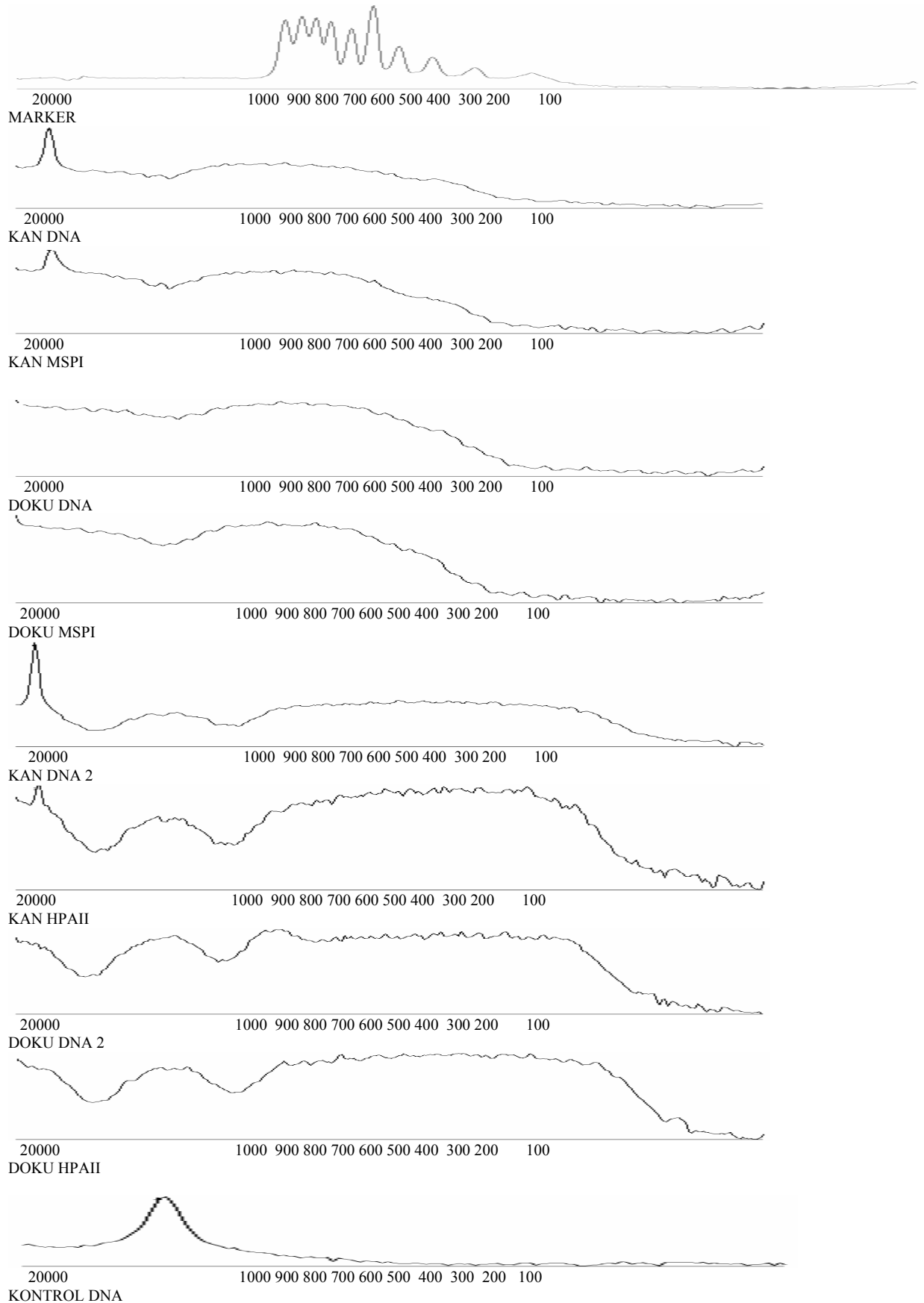
Şekil 64 - 10. Hasta, Adenokarsinom grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



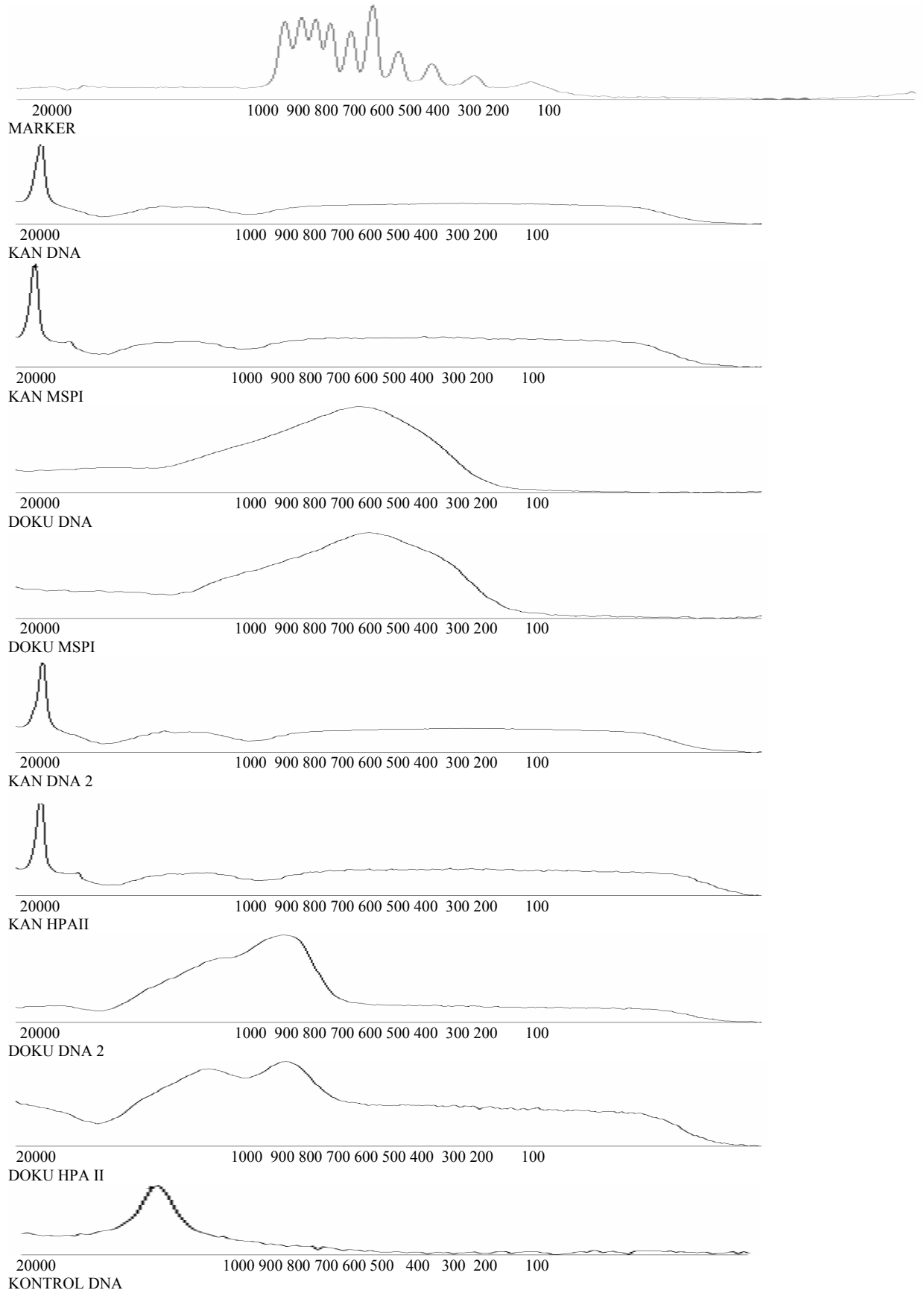
Şekil 65 -11. Hasta, Adenomüsinöz karsinom gradeII, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



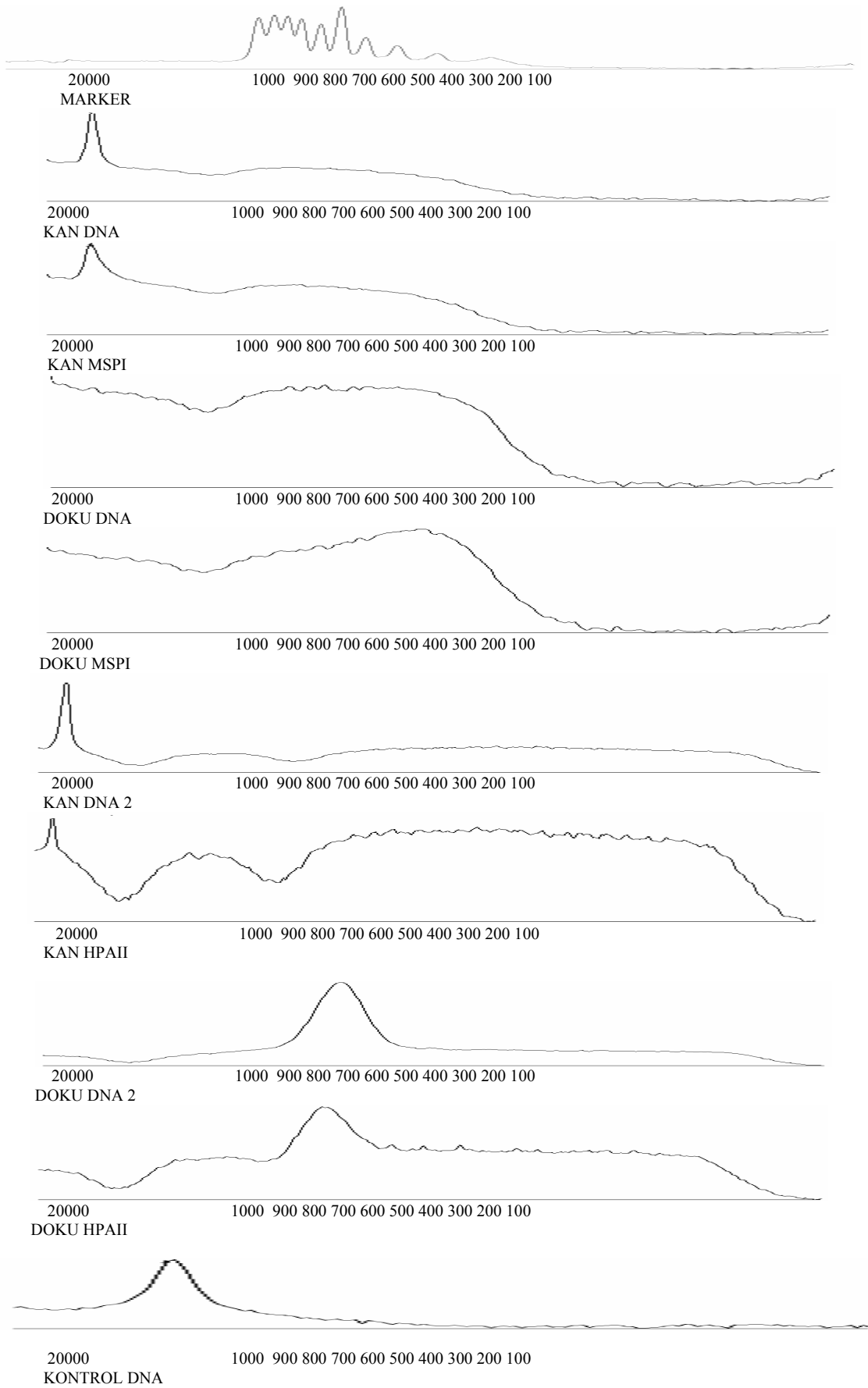
Şekil 66 - 12. Hasta, Adenokarsinom, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



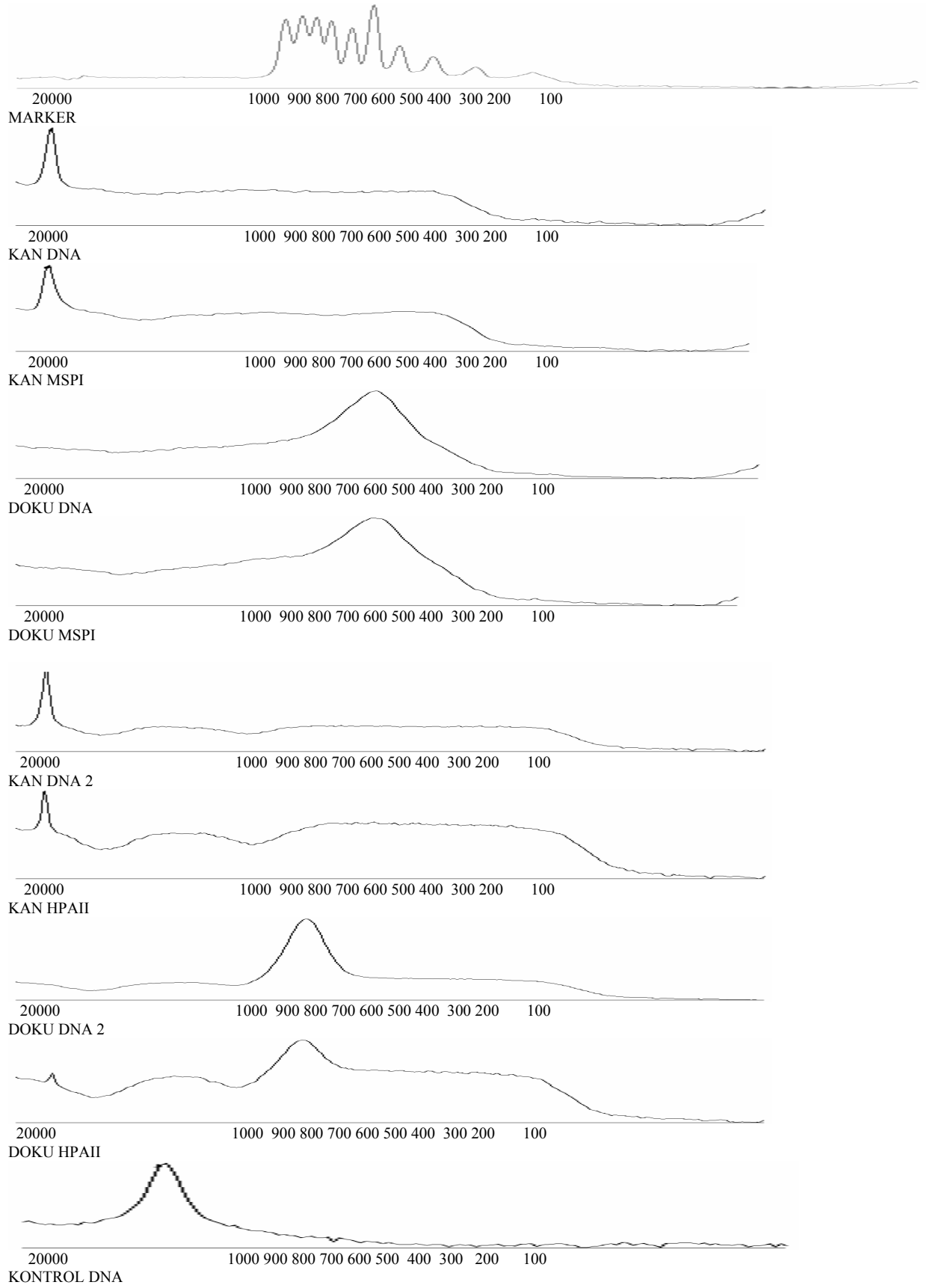
Şekil 67 - 13. Hasta, İnflamatuvar Polip, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



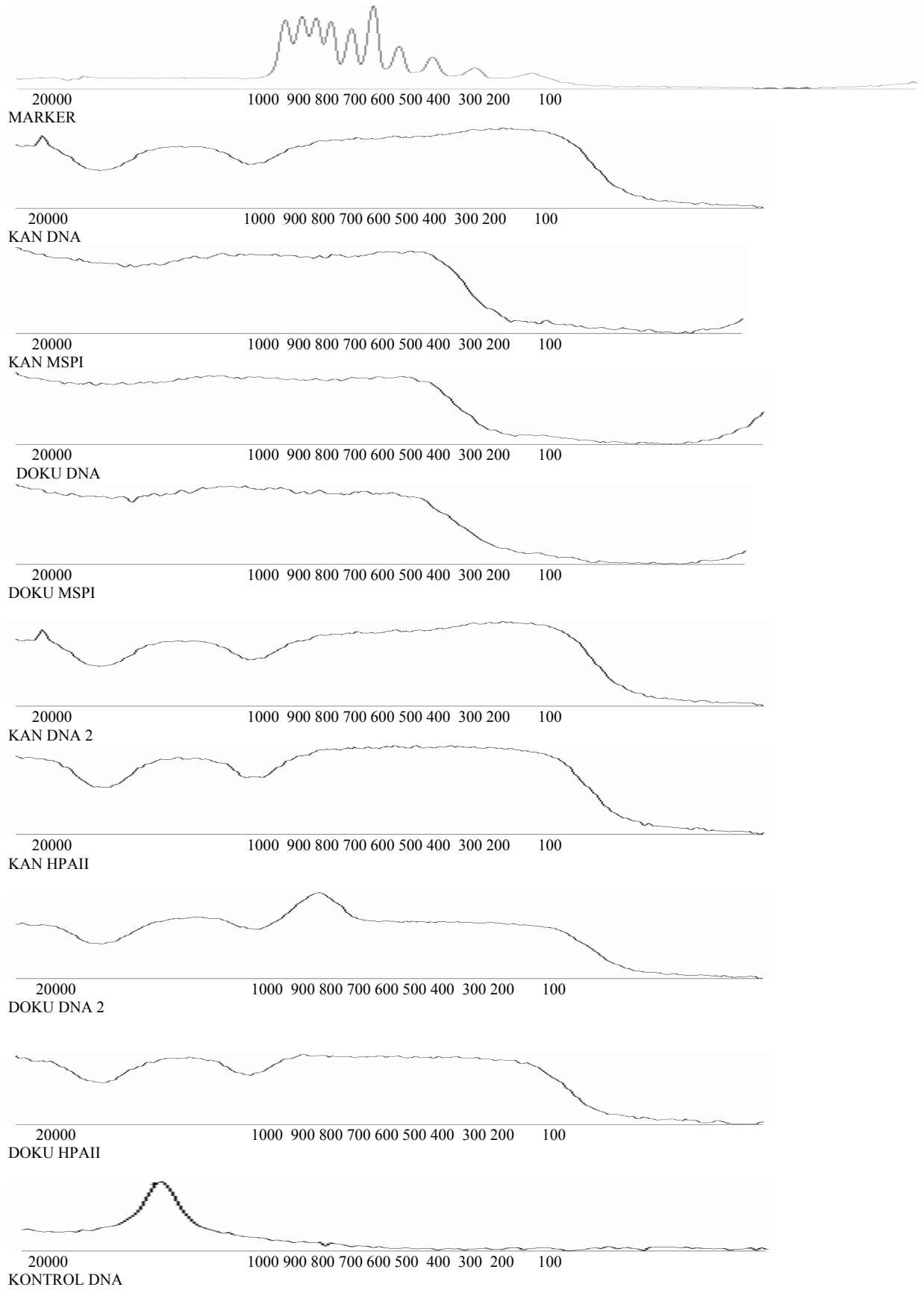
Şekil 68 - 14. Hasta, Adenomüsinöz karsinom grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



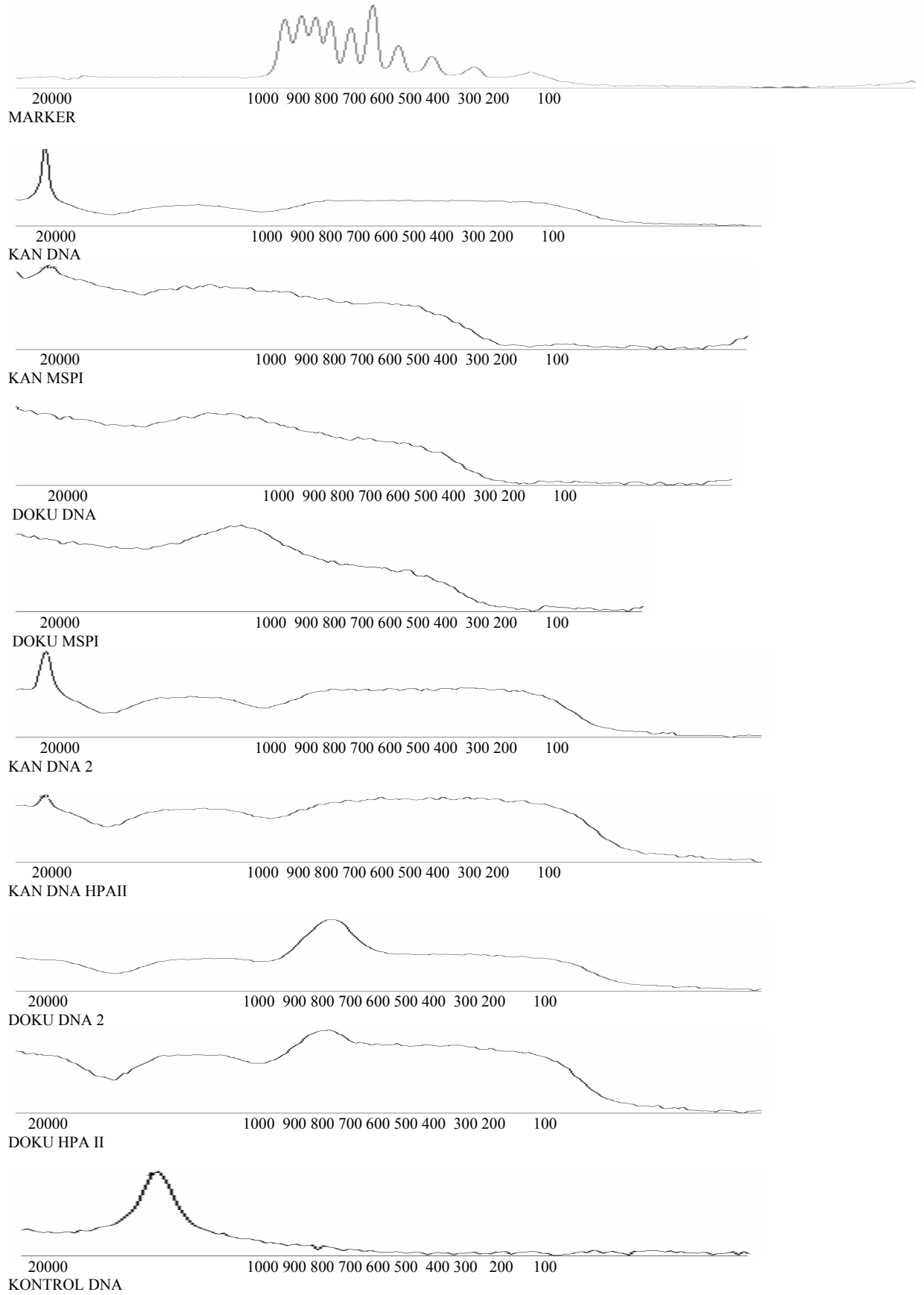
Şekil 69- 15. Hasta, Adenokarsinom grade II. orta dif., MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



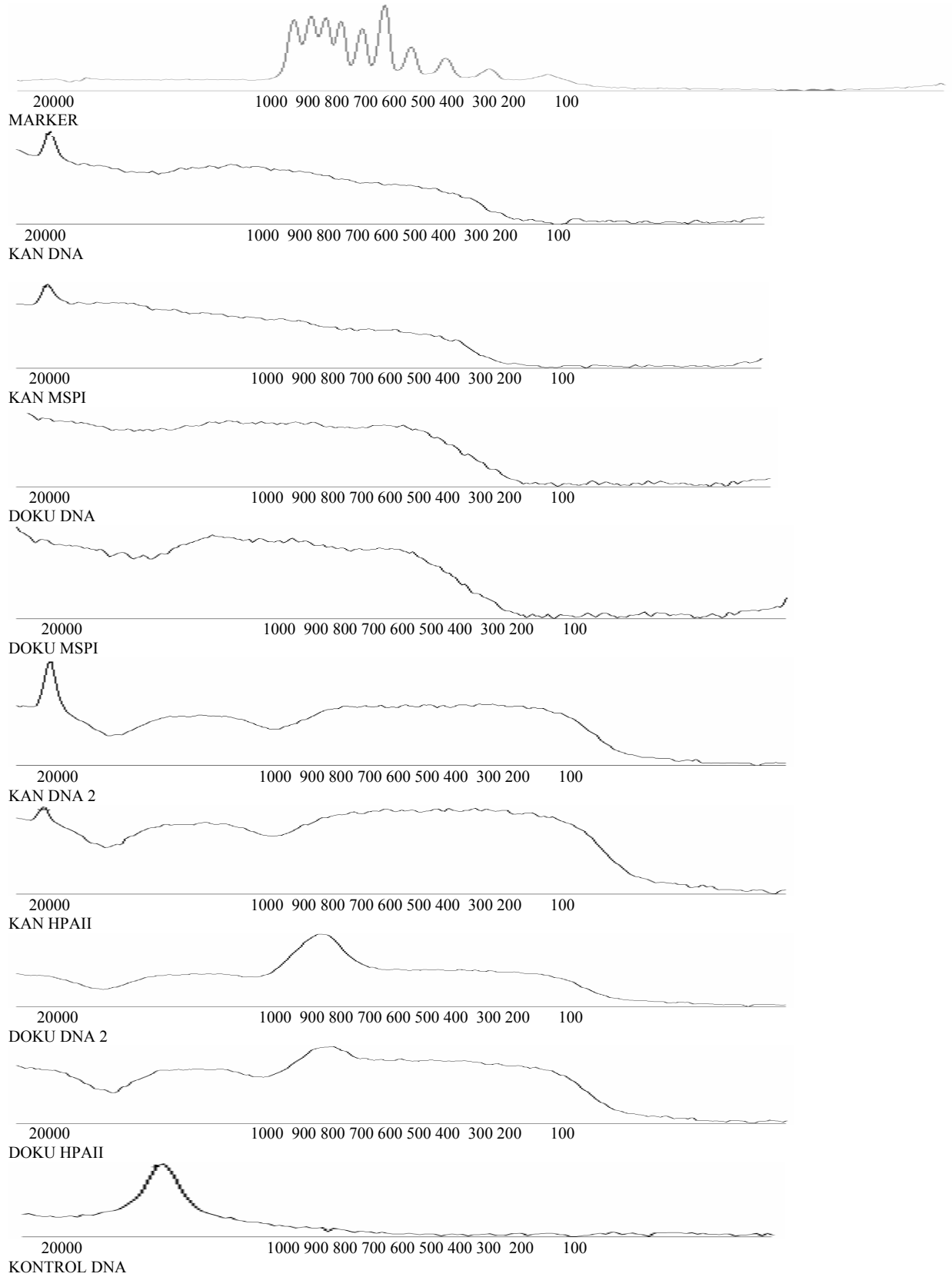
Şekil 70 - 16. Hasta, Adenokarsinom grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



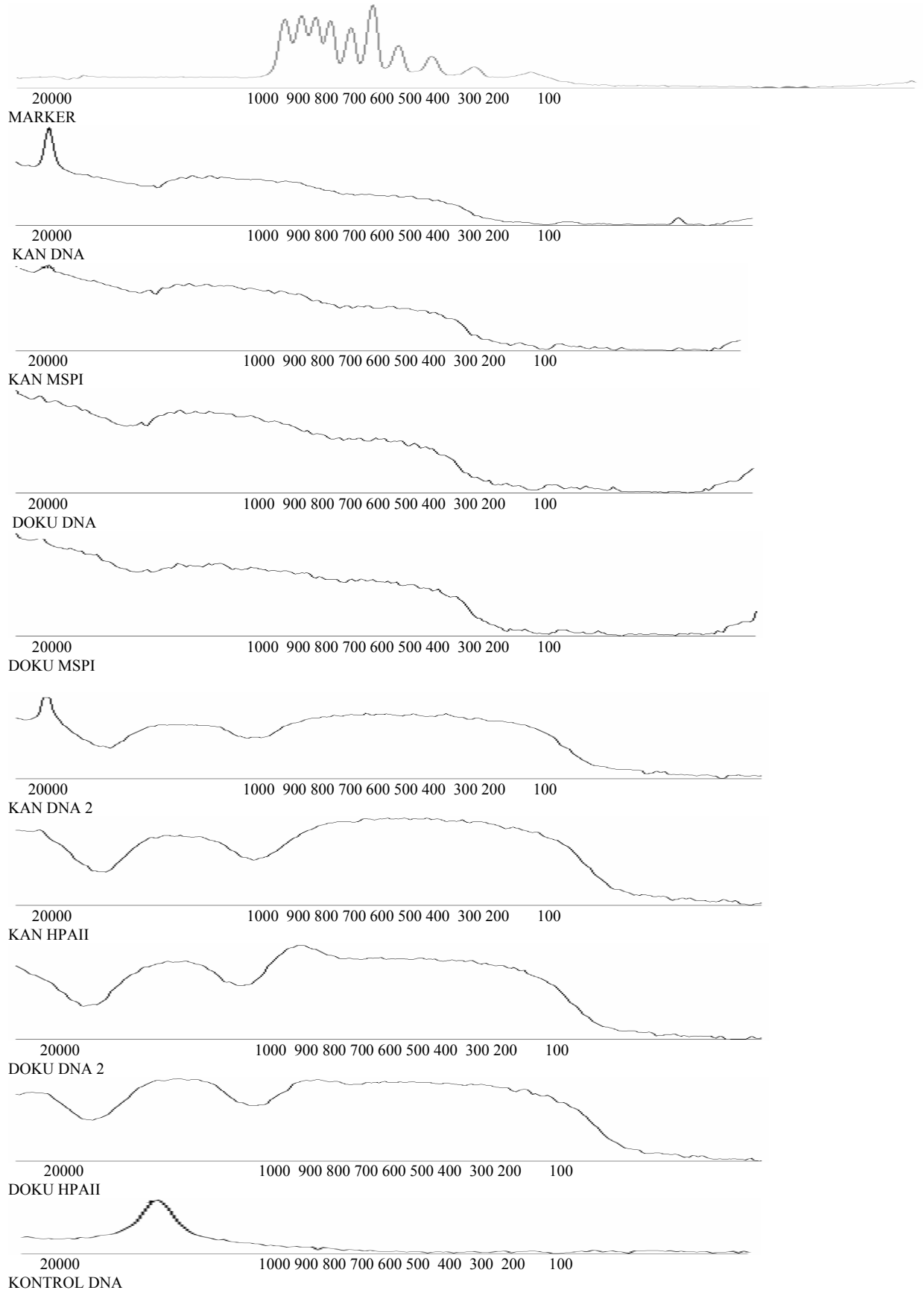
Şekil 71 - 17. Hasta, Müsinöz adenokarsinom, orta dif., MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



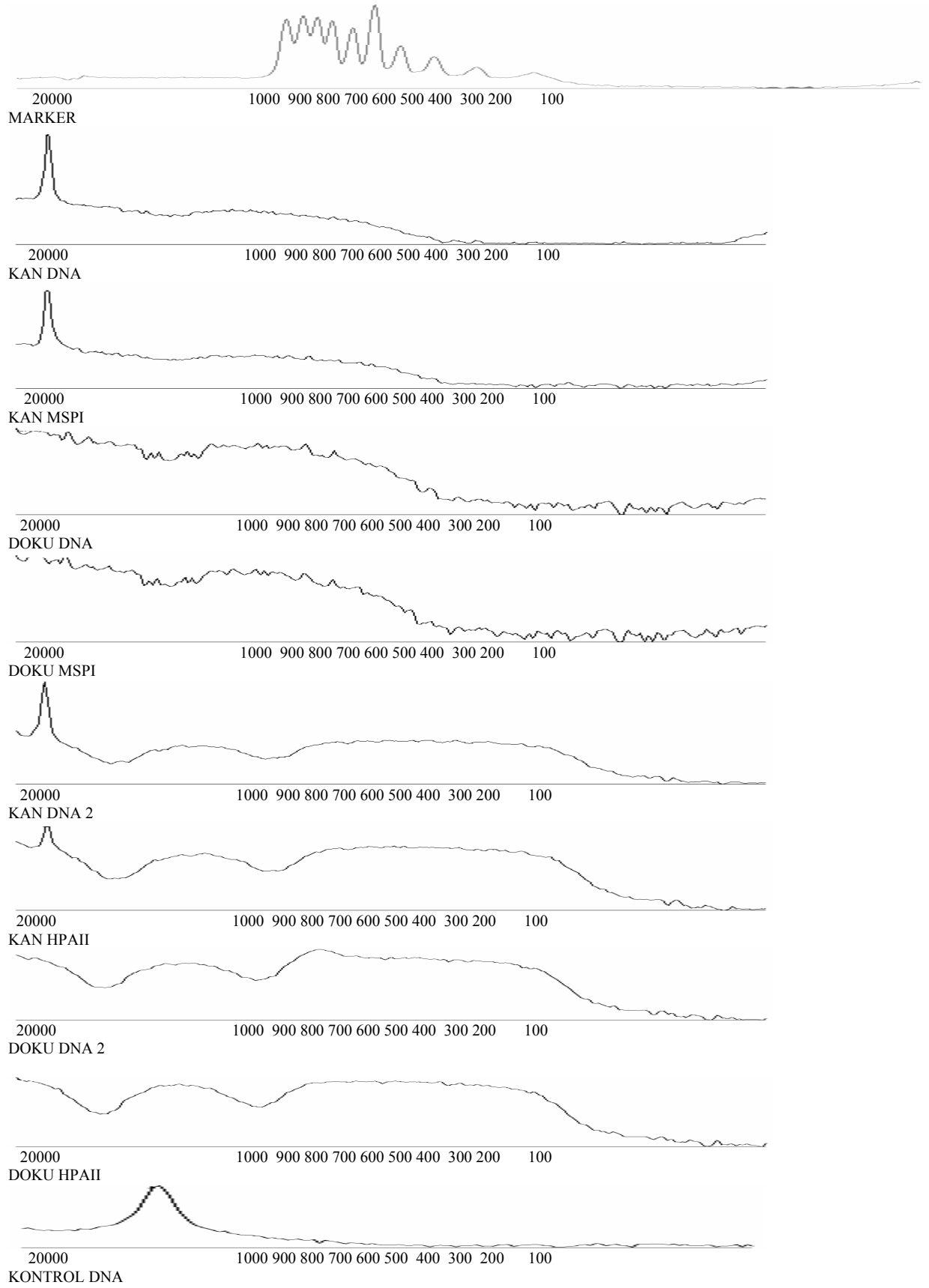
Şekil 72 - 18. Hasta, Adenokarsinom grade II, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



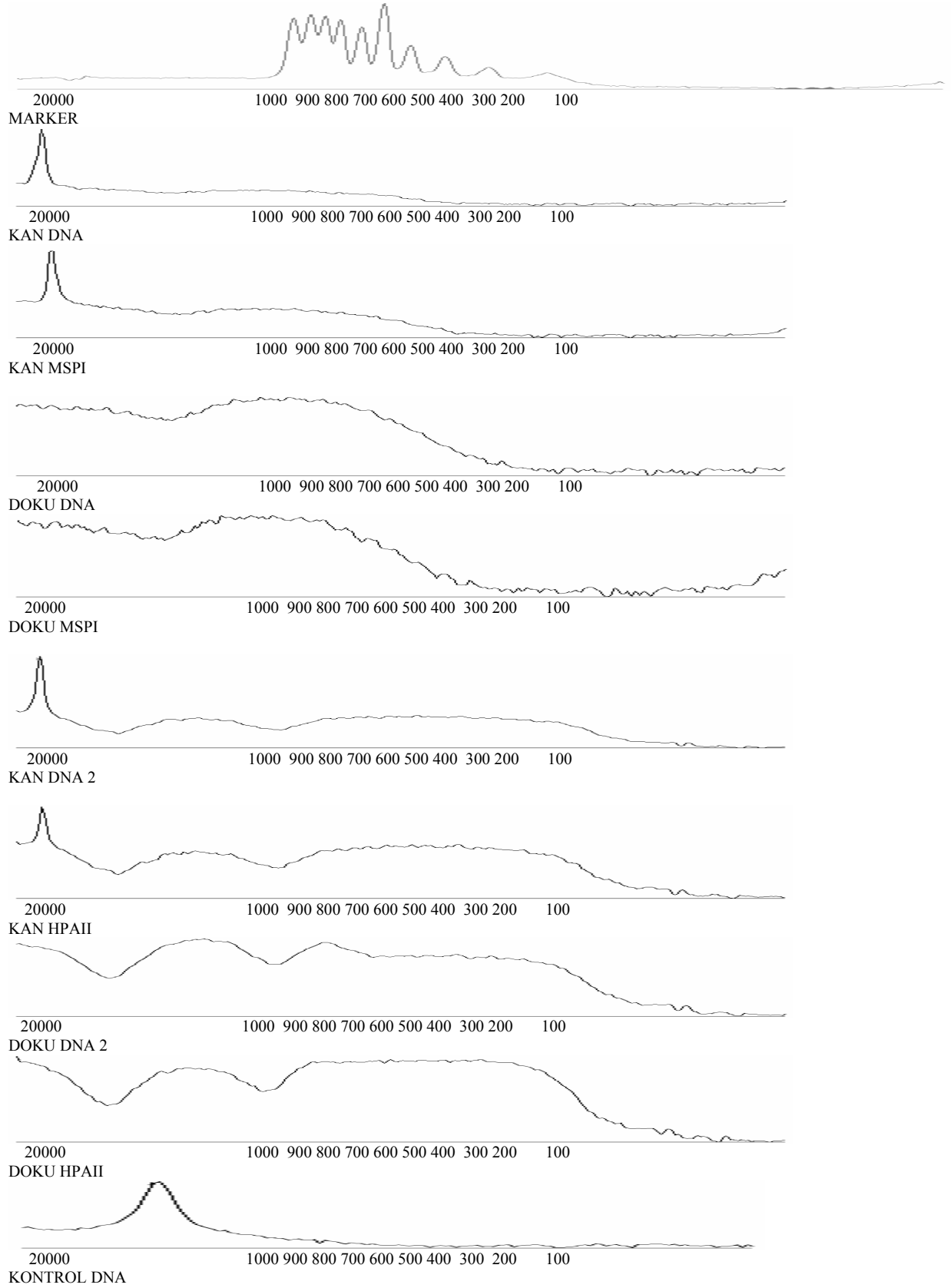
Şekil 73 - 19. Hasta, Kazeifıye Granülatöz iltihap, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



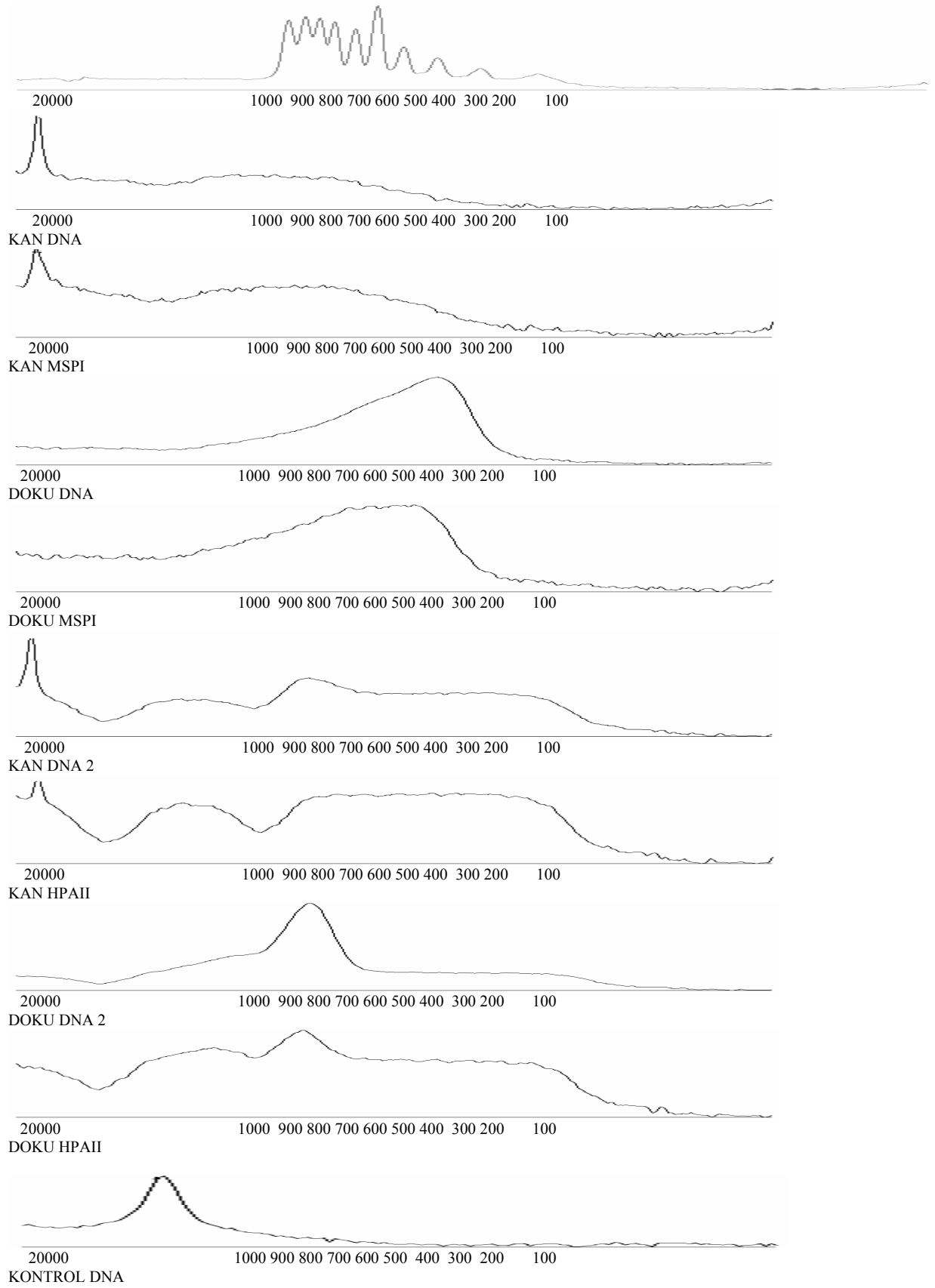
Şekil 74 - 20. Hasta, Müsinöz Adenokarsinom, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



Şekil 75 - 21. Hasta, Lokal Peritonit, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



Şekil 76 - 22. Hasta, Müsinöz Adenokarsinom, MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri



Şekil 77- 23. Hasta, Adenokarsinom orta dif., MspI ve HpaII kesim jel plot görüntüleri

V.TARTIŞMA

Kolorektal karsinoma, toplumda görülme sıklığı ve kansere bağlı ölüm sebepleri açısından en sık görülen tümörler arasında yer almaktadır. Bu kanserlerin büyük çoğunluğu sporadikken çok az bir kısmı kalıtsaldır. Kolorektal kanserlerin kalıtılan sendromları, prekürsör lezyonlar olan adenomatöz poliplerle karakterizedir ve kanserler bu öncül lezyonlardan karsinomaya dönüşmektedirler. Familyal Adenomatöz Polipozis (FAP) ve Hereditör Nonpolipozis Colorectal Carcinoma (HNPPC), tüm kolorektal kanserlerin %5'ini oluşturmaktadır. Bu kanserler FAP; %100 ve HNPPC ;%80 oranında kalıtsaldır (43).

Araştırmamız, Genel Cerrahi polikliniğine kabızlık, makattan kanama, kansızlık ve kilo kaybı şikayetleri ile başvuran ve kolonoskopi yapılarak patoloji raporu ile kolorektal malignite düşünülen 23 hastanın aile hikayeleri alınarak kalıtımın kanser üzerindeki etkisi incelenmiştir. 23 hastanın 2'sine endoskopi ile polip tanısı konmuştur. Kalan 21 hastada ameliyat sonrası patoloji raporlarına göre 18'inde kolorektal kanser tespit edilirken 3 hastanın 1'inde tüberküloz granülamatöz iltihabi yapışıklığı, 1'inde lokal peritonit ve yapışıklığı, diğer 1'inde de appendisit ve lenfoid hiperplazisi tespit edilmiştir. Kolorektal kanser tanısı almış hastalara ait aile hikayelerine göre kalıtımın rolü (aile hikayesi ve kanser ilişkisi) tablo 11'de ve kolorektal kanser ön tanısı ile ameliyat olan hastalardaki patoloji rapor özetleri tablo 10'da gösterilmiştir. Kolorektal karsinoma tanısı almış 23 hastadan sadece 1'inde, kanser bölgesinde önceden polip hikayesi vardı. Genel olarak değerlendirmeye alınan 23 hastanın 4'ünde otozomal dominant kalıtılan aile hikayesi, 1'inde birinci derece akrabalarında seminom hikayesi, 1'inde FAP hikayesi, 1'inde mesane kanseri ve uzak akrabalarında şüpheli kolon kanser hikayesi olan 2 hasta mevcuttu. Ameliyat olan ve kolorektal karsinoma tanısı kesinleşmiş hastaların kanser yerleşim lokalizasyonları şekil 37'de grafik olarak gösterilmiştir. Yerleşim yeri açısından 8 hasta sigmoid kolon, 3 hasta rekto-sigmoid bölge, 3 hasta rektum lokalizasyonlu, 2 hasta çıkan kolon, 2 hasta transvers kolon, 1 hasta ileo-çekal valv yerleşimli, 1 hasta splenik fleksura ,1 hasta ileum ve çıkan kolon, 1

hasta inen kolon, 1 hasta splenik fleksura ve diğler bir hasta da sağ kolon yerleşimli tümöre sahipti.

Çalışmamızı kolorektal karsinoma ön tanısı olarak cerrahi müdahale uygulanan 23 hasta üzerinde uyguladık. Hastalara kromozom analizine bağlı olarak karyogram çalışması, mikronükleus analiz yöntemi ve metilasyona spesifik MspI ve HpaII restriksiyon enzimi kesimi tekniklerini uygulayarak epigenetik etkinliğin kanser üzerindeki rolünü araştırdık.

Bu araştırmamızda hastalarımızda kromozom analizi sonuçları normal olarak elde edildi. Yani Tripsin Giemsa- G banding yöntemi ile materyal metotta ifade edilen kromozom analizi tekniği kullanılarak bütün hasta erkek bireyler 46,XY ve dişi bireyler de 46,XX olarak saptandı. Böylece kontrol grubu ile aynı olan normal karyogram sonuçlarına ulaşıldı. Bu bize kolorektal karsinomayla ilişkili bir kromozomal aberasyonun olmadığını göstermiştir.

Mikronükleus çalışmalarımız genomik instabilite için araştırıldı. Mikronükleus analizi çalışmamızda 21 hasta ve 21 kontrol grubundaki verilerimiz SPSS versiyon: 10.0 programına yüklenerek ikişerli gruplar halinde birbirleriyle Mann Withney U testi ile karşılaştırılmıştır. Mann Withney U testinde, erkek grubu (kolorektal kanser erkek hasta sayısı = 15, kontrol erkek bireyler = 13) $p < 0.05$ olarak, kadın grubu (kolorektal kanser kadın hasta = 6, kontrol kadın bireyler = 8) $p > 0.05$ olarak bulunmuştur. Erkek hasta ve erkek kontrol grubu arasında mikronükleus oranları açısından fark anlamlıyken, kadın hasta grubu ve kontrol grubu arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır. Genetik stabilitenin devamlılığı nedeniyle bu olgularda P53 geninin kolorektal kanser gelişimi için mutant olmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak erkek hastalarda bir farklılık göstermesinin yaşla artan CpG metilasyon oranına bağlı olabileceğini düşündürmektedir (42).

Korelasyon istatistiki çalışmasında ise erkekler için $r = 0,764$ $p < 0,05$ iken kadınlar için $r = 0,341$ $p > 0,05$ 'tir. Erkeklerde yaş ve mikronükleus oranları arasında bir korelasyon vardır. Kadınlarda ise yaş ve mikronükleus oranları arasında korelasyon yoktur. Bu incelemede mikronükleusun genetik instabilitesinde cinsiyet ve yaşa bağlı olarak farklılık gösterdiğinin işaretidir. Kolorektal karsinoma için istatistiki olarak anlam taşıyan bu durumun cinsiyet açısından hormonal yapıya bağlı olup olmadığı ayrı bir araştırma konusudur.

DNA metilasyon profili yönünde araştırmamız modifiye restriksiyon enzimleri olan MspI ve HpaII enzimleri ile 23 hastada kan ve doku DNA'sı üzerinde uygulanarak yapılmıştır. Kan DNA'sı için yapılan uygulamada MspI enzimi 23 hastamızın tamamında kesim yapmıştır. HpaII enzimi uygulamasında ise 2 hastada kesim yapmadığı ve bu kesim noktasının hipermetile olduğu tespit edilmiştir. Yani bu 2 hastada epigenetik nedene bağlı tümör supresör genin sessizleştirildiği anlaşılmıştır. Halbuki 21 hastada ise HpaII enziminin kan DNA'sını kestiği ve DNA'nın hipometile olduğunu saptandı. Hipometile olan bu durumlarda APC tümör supresör geninin kontrolünü kaybetmiş olması ise bu gende delesyon, mutasyon ve ailevi kalıtım gibi nedenlere bağlı bir probleme sahip olduğunu göstermektedir. Bu durumda olayın bir epigenetik zemine değil , genin yapısı ile ilgili bir duruma bağlı olduğunu görürüz. Bu epigenetik sürecin promoter gen yapısı düzeyinde de etkili olabileceği ve bütün metilasyonun spesifik bisülfıt tekniği ile incelenmesi ayrı bir konu olarak önümüzde durmaktadır.

Hpa II enzim kesimi ile kolorektal adenokarsinomunun %8.7.'sinin epigenetik nedenlerle (hipermetilasyon veya genomik imprinting), % 91,3'ünün ise diğer genomik seviyede oluşan mutasyon, delesyon ve kalısal olarak aileden gelen sebeplere bağlı olduğu kanısına varmış bulunuyoruz.

Doku DNA'sında ise MspI'in 23 hasta doku DNA'sının restriksiyonla kesime uğradığı saptanmıştır. HpaII ile doku DNA'sında 4 hastada restriksiyon yapmadığı ve 19 hastada restriksiyon yaptığı ortaya çıkmıştır. DNA kesimi yapmadığı hastaların ikisinde polip ve diğer ikisinde ise müsinöz adenokarsinoma saptanmıştır. Bu bize epigenetik zemine bağlı bir şekilde kolorektal adenokarsinomaya ulaşma sürecinin işlediğini göstermektedir. Geri kalan 19 hastada ise DNA kesiminin etkin bir şekilde olması olayı hem APC geninin zemininde mutasyon, delesyon ve ailevi kalıtsal nedenle gittiğini gösterirken hem de epigenetik yapısının rol oynadığını göstermektedir. Epigenetik neden (hipermetilasyon) doku DNA'sında %17.4 oranında iken hipometile neden ise (mutasyon,delesyon,ailevi kalıtım ve epigenetik nedenlere bağlı pre-onkogen ve onkogenlerin aktivasyonu) % 82.6 oranında sorumludur.

Yine tablo 12 de görüldüğu gibi HpaII'nin kan DNA'sında kesemediği 2 hipermetile bölgenin, doku DNA'sında kesildiği görülmüştür. Bu da epigenetik olayın etkinliğinin çevre faktörlerinin etkisiyle dokudan dokuya farklılık gösterdiği gibi dokuya özđu aktivasyon emri alıp almamasına bağlıdır. Kolorektal adenokarsinoma dokusunda

doğrudan dokuya özel hipermetilasyon sonucu ile oluşan durumun farklılığını göstermektedir. Polipli iki olguda hem kan hem de doku DNA'larında kesim profilleri benzer olarak hipermetilasyon göstermiştir. Bu polip yapısı ile kanser sürecini kontrol eden üst hücre sistemlerinin ileri reaksiyon nedeniyle çemberini kırılmasıyla sitemin kanserojenezise dönüşümünün sağlanacağı düşünülebilir. Bu enzimlerin kesim özellikleri grafiklerde gösterilerek teyid edilmişlerdir. Epigenetik nedenler kan DNA'sında % 8.7 ve doku DNA'sında % 17.4 de olsa yine de önemli bir yüzde olduğundan hipermetilasyon mekanizmasını hipometile etmek üzere bir tedavi mekanizması geliştirilirse, 23 hastadan 5 hastanın tedavi edilmesi olasılık olarak görülmektedir. Diğer % 91.3 ve % 82.6' sında gen onarım tedavisi veya genin kendisini kolorektal adenokarsinoma dokusunda ifade etmesini önleyici sağaltımı uygulanabilir. Hipometilasyon gösterme durumlarında bazen DNA tamir mekanizma bozukluğu sonucunda MLH1(3p'de yerleşmiş) ve MSH2 sporadik kolon kanserleri sonucu olduğu belirlenmiştir. Kolon kanserleri % 10- 15 oranında bir gen mutasyonuna bağlı hipometilasyon ve aynı zamanda MLH1 gen promoter bölgesinde oluşan hipermetilasyon sonucu epigenetik mekanizmanın rolü de unutulmamalıdır (74,75). Ancak kolorektal adenokarsinoma patolojik tanı aldığında ve MspI ve HpaII kesimleri etkili olduğu genin APC olduğu yönünde epigenetik rol ve değişime uğramış yapılar değerlendirilmeye alınmıştır. Bu bize hipometilasyon mekanizmasında APC geni yapı değişimini (mutasyon, delesyon vs.) göstermiştir. MLH1 ve MSH2 genleri hipometilasyon nedenleri de saf dışı edilememiştir. Bu genlerin yeniden kendini ifade etmesi 5 AZA- CdR tedavisi ile yeniden kazanılmaktadır.

Kolorektal kanser yerleşim yerleri baktığımızda en yaygın yerleşim yeri sigmoid, rektosigmoid kolonlarda ve rektumda görülmüştür (şekil 37). Böylelikle kanserin çeşitli basamaklarında etkili çevre faktörlerinin olduğu düşünülmektedir. Bu bölgelerde dışkının uzun zaman kolonda kalması ve buna bağlı olarak çevre faktörlerinin etkisiyle oluşabileceği anlaşılabilir.

HpaII restriksiyon enziminin kesim yapması hipometilasyonu yönünden etki ettiğinden tümör supresör genlerde ve bunun öncü etkileri 5q kolunda haritalanmış APC geninde itibaren mutasyon, delesyon ve ailevi kalıtım nedeniyle daha sonraki basamaklarda Ki-ras, DCC ve p53 gen hipermetilasyonu (epigenetik) ile değişime uğramasının yanında mutasyon, delesyon ve ailevi kalıtım'ın göstergesi olabileceği bize göstermektedir. Bu hipermetilasyon özelliği pre-onkogen ve onkogen aktivasyonu

için bir hipometilasyon sürecini oluşturup işlemleri kontrol edemediğini göstermektedir. Hastalarımızın kan DNA'sında % 8.7 ve doku DNA'sında % 17.4'ünde epigenetik yani hipermetilasyon ya da başka bir deyimle genomik imprinting mekanizması etkin iken, Kan DNA'sında % 91.3 ve doku DNA'sında % 82.6 oranında mutasyon, delesyon ve kalıtsal sebeplerin tetikleyici mekanizmasının kolorektal adenokarsinomanın çeşitli darbe basamakları ile oluştuğu anlaşılmaktadır. Bu konuda Figola ve arkadaşlarının (193) yaptıkları çalışmada karsinomada, adenomaya göre hipermetilasyon seviyeleri daha yüksek, adenomada ise hipometilasyon seviyeleri karsinomaya benzer değerde bulunmuştur. Adenomadaki bulguları diğer çalışmalarla benzer bulunduğunu ifade etmiştir. Bu çalışmada hipometilasyon ve hipermetilasyon, hastanın cinsiyeti, yaşı, tümörün evresi ve spesifik genin hipermetilasyonundan bağımsız bir ilişki göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise genetik instabilite yönünde erkek bireylerde cinsiyeti nedeniyle farklılık göstermiştir. Figola ve arkadaşlarının(193) hiyerarşik küme analizleri yaparak Ki-ras ve p53 genlerinde özel bir mutasyonel spektrumla birliktelik gösteren DNA metilasyonunun iki ana örneğini bize göstermiştir ve yaşam ile giden hipo ve hipermetilasyonun alternatif korelasyonu ile de uyumlu bulunmuştur.

Kolorektal karsinomada tümör ilerlemesinde farklı rol oynar görünen DNA hipo ve hipermetilasyonu bağımsız bir süreç içinde gitmektedir ve kolorektal tümörlerin alt grupları spesifik genetik ve epigenetik bulguları ileri yaşam ile farklı korelasyon göstermiştir. Bu ifadelerle de bizim çalışmamızda hipometilasyon ile giden ve dolayısıyla tümör supresör gen/genlerde mutasyon, delesyon gibi rolleri oluşumu ile hipermetilasyon gibi epigenetik(genomik imprinting- sessizleştirilme) özellik her bir kolorektal karsinomada bağımsız oluşması ile uyumludur.

Kolorektal karsinomada görülen genomik hipometilasyon diğer bazı tipteki kanserlerde de çeşitli araştırmacıların yaptıkları farklı çalışmalarda prostatın metastatik tümörlerinde ve normal prostat dokusunda (196), B-hücreli kronik lenfositik lösemide lökositlerde ve normal lökositlerde (197), hepatosellüler karsinomada ve hepatoma olmayan normal karaciğer dokusunda (198) ve servikal kanserde ya da yüksek derecede displastik servikal lezyonlarda, normal servikal dokuda ya da serviksin düşük dereceli displazilerinde (199) gösterilmiştir.

DNA hipermetilasyonu önemli bir tanı ve prognoz aracı olarak ortaya çıkmaktadır. DNA hipometilasyonu kanser araştırmalarında ve hastalığın yönetilmesinde önemli olabilir. Tekrarlayan hipometilasyon veya DNA dizilerinin tek sağlam kopyasının mutasyon ve

delasyon sonucu bazı tümörlerin ortaya çıkması ve ilerlemesi anlamlı bulunmuştur (200,201,202). Dahası ileri çalışmaların bir serisinde Linn ve arkadaşlarının 2001 yılında, Shen ve arkadaşlarının 1998, Soares ve arkadaşlarının 1999 yılında yaptıkları çalışmalarda tümör safhası, ilerlemesi, tümör derecesi ve çeşitli zayıf prognoz indikatörleriyle global DNA metilasyon seviyelerinde anlamlı bir azalmayı göstermiştir (202,203,204). Bu'da yukarıda yüzdesini verdiğimiz ve daha yüksek oranda bulunan hipometilasyon (kan DNA'sında % 91.3 ve dokunda DNA'sında % 82.7) mekanizması yukarıdaki verilerle uyumlu bulunmuştur.

Kanserde global DNA hipometilasyonu anlamlı olarak bazı DNA tekrar dizilerinin hipometilasyonu ile olan birlikteliği gösterilmiştir (200). Kanserlerin bazı tipleri için ilave olarak DNA hipometilasyonu , tümörögenезisin erken indikatörü olarak görülmüştür (200, 205). Bununla beraber DNA hipometilasyonu için araştırmalar CpG adalarının hipermetilasyon analizlerine klinik olarak faydalı ek bilgi oluşturmaktadır. DNA hipometilasyonu ile birlikte giden kanser çalışmaları, davranışı belli olmayan DNA metilasyonu ile kanser tedavisi için amaçlanan bir sebep olarak düşünülmüştür. DNA hipermetilasyonu ile birlikte giden kanserde olduğu gibi DNA hipometilasyonuna bağlı kanserde de genellikle ve ihtimal dahilinde olmayan karsinogenез için kafi gelmektedir. Örneğin, normal plasental DNA tamamiyle unmetiledir ki normal satellit DNA'nın hipometilasyonu, normal postnatal somatik dokularla ilişkilidir. Dahası ICF sendromlu çocuklarda çok nadir DNA metilasyonu yetersizliği ve kromozomal kırık sendromları rastlanmış ve bunlarda kansere sahip olma rapor edilmemiştir.

Bununla beraber yukarıdaki yorumların ve önerilerin ışığında kansere bağlı hipometilasyonun, tümörögenезis ve tümör progresyonuna sık katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bundan dolayı CpG metilasyonlarını baskılarken, kanser tedavisinde kısa süreli faydalar sağlayarak kanser hücrelerinin ilerlemesini azaltmıştır (206). Bu da bizim hastamızda ya da benzer hastalarda ileride dokuya özgü hipometilasyon mekanizması olduğu yerlerde, hipermetilasyon sağlanarak, kolorektal adenokarsinomanın kontrol edilebileceği düşüncesini araştırmak, uygulamak için aklımıza getirirken, başka yan etkilerinin ne olabileceği konusunda kapalı olan araştırmaya açıktır.

DNA hipermetilasyonu olan tümör supresör genlerde ide epigenetik nedenlere bağlı epigenomik imprintingi ortadan kaldırmak için ise hipometilasyon mekanizmasını uygulamak gerektiğini akla getirmektedir.

Bu alışmamızda kolorektal karsinomanın etyolojisinde epigenetik nedenlerle giden hipermetilasyon (kan DNA'sında % 8.7, doku DNA'sında %17.4) ve hipometilasyon (kan DNA'sında % 91.3 ve doku DNA'sında % 82.6) nedenine bağlı sonuçlarla karşılaştırmış bulunmaktayız. Epigenetik rolünün de yadsınamayacak kadar az olmadığı anlaşılmaktadır. Yani gen ekspresyonuna dayanan bilgi akışında kolorektal kanserde rol oynadığı açıktır. Tabiki bunun yanında gen dizisi ile ilişkili olan mutasyon ve delesyon ile kolorektal adenokarsinoma etyolojisindeki rolünün çok daha yüksek olduğu bu iki nedenin o geçtiği en yüksek yüzde ile karşıımızda durmaktadır.

VI.SONUÇLAR

1-Wang ve arkadaşlarının 1992 yılında Çin toplumunda kolorektal kanserli hastalarda yaptıkları periferik kandan sitogenetik çalışmasına paralel olarak yaptığımız klasik periferik kandan kromozom analizi çalışmasında değerlendirmeye alınan 23 kolorektal karsinoma ön tanısı ile değerlendirmeye alınan hastalarda herhangi bir kromozomal sayısal ve yapısal bir anomali saptanmamıştır. Sağlıklı kontrol bireylerden yapılan 23 klasik periferik kandan kromozom analiziyle karşılaştırılmış fark bulunmamıştır.

2-Bunun yanında genomik instabilitenin değerlendirilmesi açısından aynı hasta grubunda periferik kandan hazırlanan preparatlardan 5000 hücre sayılarak erkek ve kadınlarda mikronukleus oranları araştırılmış özellikle erkek bireylerde mikronukleus oranları hasta grubunda kontrol grubuna göre ($P < 0.05$) anlamlı bulunurken , kadın hasta ve kontrol grubunda ise Mann Witney U testi ile kanser yatkınlığı açısından anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Aynı zamanda hasta ve kontrol grubu arasında ayırım yapmaksızın erkeklerde, yaş ve mikronükleus oluşum sıklığının artışında anlamlı bir korelasyon bulunmuştur (Erkekler için $r = 0,764$ $p < 0,05$, Kadınlar için $r = 0,341$ $p > 0,05$), (tablo 3- 9 ve şekil 35-36).

3- Araştırmamız, Genel Cerrahi polikliniğine kabızlık, makattan kanama, kansızlık ve kilo kaybı şikayetleri ile başvuran ve kolonoskopi yapılarak patoloji raporu ile kolorektal malignite düşünülen 23 hastaya (hasta onayı : onam formu alınarak) uygulanmıştır. 23 hastanın 2'sine endoskopi ile polip tanısı konmuştur. Kalan 21 hastada ameliyat sonrası patoloji raporlarına göre 18'inde kolorektal kanser tespit edilirken 3 hastanın 1'inde tüberküloz granülatöz iltihabi yapışıklığı, 1'inde lokal peritonit ve yapışıklığı, diğer 1'inde de appendisit ve lenfoid hiperplazisi tespit edilmiştir. Kolorektal kanser tanısı almış hastalara ait aile hikayelerine göre kalıtımın rolü (aile hikayesi ve kanser ilişkisi) tablo 11'de ve kolorektal kanser ön tanısı ile ameliyat olan hastalardaki patoloji rapor özetleri tablo 10'da gösterilmiştir. Kolorektal karsinoma tanısı almış 23 hastadan sadece 1'inde, kanser bölgesinde önceden polip hikayesi vardı. Genel olarak değerlendirmeye alınan 31 hastanın 4'ünde otozomal dominant kalıtılan aile hikayesi, 1'inde birinci derece akrabalarında seminom hikayesi,

1'inde FAP hikayesi, 1'inde mesane kanseri ve uzak akrabalarında şüpheli kolon kanser hikayesi olan 2 hasta mevcuttu. Ameliyat olan ve kolorektal karsinoma tanısı kesinleşmiş hastaların kanser yerleşim lokalizasyonları şekil 37'de grafik olarak gösterilmiştir. Yerleşim yeri açısından 8 hasta sigmoid kolon, 3 hasta rekto-sigmoid bölge, 3 hasta rektum lokalizasyonlu, 2 hasta çıkan kolon, 2 hasta transvers kolon, 1 hasta ileo-çekal valv yerleşimli, 1 hasta splenik fleksura, 1 hasta ileum ve çıkan kolon, 1 hasta inen kolon, 1 hasta splenik fleksura ve diğer bir hasta da sağ kolon yerleşimli tümöre sahipti.

4-Genomun metilasyon patternini göstermek ve sağlam doku ve kanser dokusu arasındaki metilasyon pattern farklılığını göstermek açısından metilasyona spesifik modifiye restriksiyon endonükleazlar olan MspI ve HpaII ile olan enzimlerle yapılan kesim profilleri tablo 12 de ve scion image grafiklerinde gösterildiği gibidir. MspI ve HpaII modifiye restriksiyon enzimlerinin metile sitozini tanıma özgüllüklerinin farklı olmasına dayandırılarak yapılan kesim çalışmalarından yararlanılarak çıkardığımız sonuçlara göre kan DNA'sı üzerinde epigenetik rolün (hipermetilasyon veya genomik imprinting) oranı %8.7 olarak bulunmuştur. % 91,3'ünde ise diğer genomik seviyede oluşan mutasyon, delesyon ve kalısal olarak aileden gelen sebeplere bağlı olduğu kanısına varmış bulunuyoruz. Epigenetik neden (hipermetilasyon) doku DNA'sında %17.4 oranında iken hipometile neden ise (mutasyon, delesyon, ailevi kalıtım ve epigenetik nedenlere bağlı pre-onkogen ve onkogenlerin aktivasyonu) % 82.6 oranında sorumludur. Buradan yola çıkarak epigenetik değişikliklerin dokuya özgü değişiklikler olduğunu ve kanser etyo-patogenezinde önemli olduğunu söylemek mümkündür.

5- Bu etyolojik özelliklere bağlı olarak kolorektal kanserde epigenetiğin yanında çoğunluğu mutasyon, delesyon ve ailevi kalıtımla giden hipometilasyon mekanizmalarının da önemli rolü saptanmıştır.

VII. KAYNAKLAR

- 1- www.atonet.org.tr , 2006; Kanser Yüku Raporu.
- 2- Ozsoy S.A., Ardahan M., Ozmen D. Reliability and validity of the colorectal cancer screening belief scale in Turkey. *Cancer Nurs* 2007;30:139- 45.
- 3- Morin PJ., Vogelstein B., Kinzler KW., Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 7950– 4.
- 4- www.kanservakfi.org , 2006,Türkiye Kanser Araştırma Merkezi.
- 5- Schwartz S.I., Shires G.T., Spencer F.C., Daly J.M., Fisher J.E., Galloway A.C., 1999, Volume 2, Colon, rectum and Anus..in:Principles of surger. Ed. S. I. Schwartz, seventh edition, a division of The McGraw-Hill Companies, New york St., p: 1336- 40.
- 6-Zuidema G.D., Yeo C. J., 1996, Volume 4, Colon. in: Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract. Ed. J H Pemberton, fifth edition, W.B. Saunders Company, Philedelphia, Pennsylvania, p: 226.
- 7-Corman M.L., Allison S.I., Kuehne J. P., 2002, Handbook of Colon & Rectal Surgery by Lippincott Williams & Wilkins 530 Walnut street Philedelphia, PA 196 USA, p:423- 7.
- 8- Odze R.D., Goldblun J. R., Crawford J.M., 2004, Surgical Pathology of the G I Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas, Saunders Company(An Imprint of Elsevier), Philedelphia, Pennsylvania 19106.chapter 19, p: 442.
- 9-Kalaycı G., 2002, Kolon Kanserleri, Genel Cerrahi, (2.cilt), Nobel Tıp Kitabevleri, sayfa: 1343- 459.
- 10- Odze R.D., Goldbulin J.R., Crawford J.M., 2004, Surgical Pathology of the G I Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas, Saunders Company(An Imprint of Elsevier), Philedelphia, Pennsylvania 19106. chapter 19, p: 446- 55.
- 11-Schwartz S.I., Shires G.T., Spencer F.C., Daly J.M., Fisher J.E.,Galloway A.C., 1999, Volume 2, Colon, rectum and Anus. in: Principles of surger. Ed. S I Schwartz, seventh edition, a division of The McGraw-Hill Companies, New york St., p: 1350-1.
- 12-Zuidema G.D., Yeo C. J., 1996, Volume 4, Colon. in: Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract. Ed. J. H. Pemberton, fifth edition, W.B. Saunders Company, Philedelphia, Pennsylvania, p: 224-5.

- 13- Odze R. D., Goldbulin J. R., Craawford J. M., 2004, Surgical Pathology of the G I Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas, Saunders Company (An Imprint of Elsevier), Philedelphia, Pennsylvania 19106. chapter 19, p: 456- 7.
- 14-Klug W.S., Cummings M.R., 2003, Genetik Kavramlar, 6.baskı, Öner C., Palme Yayıncılık, Ankara, sayfa: 444-5.
- 15-Kinzler K.W., Nilbert M.C., Su L.K., Vogelstein B., Bryan T.M., Levy D.B., Smith K.J., Preisinger A.C., Hedge P., McKechnie D., Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. Science. 1991; 253: 661-5.
- 16-Kikuchi-Yanoshita R., Konishi M., Ito S., Seki M., Tanaka K., Maeda Y., Iino H., Fukayama M., Koike M., Mori T., Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients.Cancer Res.1992 ; 52 : 3965-71.
- 17- Ahnen D.J.,Feigl P., Quan G., Fenoglio-Preiser C., Lovato L.C., Bunn P.A. Jr., Stemmerman G., Wells J.D., Macdonald J.S., Meyskens F.L. Jr., Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. Cancer Res. 1998 ; 58 : 1149-58.
- 18-Hussain S.P., Harris C.C., Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. Mutat Res. 2000 ; 462 : 311-22 .
- 19- Fearon E. R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 1990 ; 61: 759-67.
- 20-Bodmer W.F., Bailey C.J., Bodmer J., Bussey H.J., Ellis A., Gorman P., Lucibello F.C., Murday V.A., Rider S.H., Scambler P., Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. Nature. 1987 ; 328 : 614-6.
- 21-Groden J., Thliveris A., Samowitz W., Carlson M., Gelbert L., Albertsen H., Joslyn G., Stevens J., Spirio L., Robertson M. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. Cell. 1991; 66 : 589-600.
- 22-Joslyn G., Carlson M., Thliveris A., Albertsen H., Gelbert L., Samowitz W., Groden J., Stevens J., Spirio L., Robertson M., Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus.Cell. 1991; 66 : 601-13.

- 23- Nishisho I., Nakamura Y., Miyoshi Y., Miki Y., Ando H., Horii A., Koyama K., Utsunomiya J., Baba S., Hedge P., Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*. 1991 ; 253 : 665-9.
- 24- Miyoshi Y., Nagase H., Ando H., Horii A., Ichii S., Nakatsuru S., Aoki T., Miki Y., Mori T., Nakamura Y., Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet*. 1992 ; 1: 229-33.
- 25- Powell S.M., Zilz N., Beazer-Barclay Y., Bryan T.M., Hamilton S.R., Thibodeau S.N., Vogelstein B., Kinzler K.W., APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 1992 ; 359 : 235-7.
- 26- Smith K.J., Johnson K.A., Bryan T.M., Hill D.E., Markowitz S., Willson J.K., Paraskeva C., Petersen G.M., Hamilton S.R., Vogelstein B., The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 ; 90 : 2846-50.
- 27- Kinzler K.W., Vogelstein B., Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996; 87 : 159- 70.
- 28- Ichii S., Takeda S., Horii A., Nakatsuru S., Miyoshi Y., Emi M., Fujiwara Y., Koyama K., Furuyama J., Utsunomiya J. Detailed analysis of genetic alterations in colorectal tumors from patients with and without familial adenomatous polyposis (FAP). *Oncogene*. 1993 ; 8 : 2399- 405.
- 29- Levy D.B., Smith K.J., Beazer-Barclay Y., Hamilton S.R., Vogelstein B., Kinzler K.W., Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors. *Cancer Res*. 1994 ; 54: 5953-8.
- 30- Knudson A. G. Jr., Mutation and cancer : Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* . 1971 ; 68 : 820.
- 31- Renkonen E.T., Genetic Basis of Hereditary Colorectal Cancers: Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and Familial Adenomatous Polyposis. Department of Medical Genetics, Biomedicum Helsinki, University of Helsinki, Finland. 2006; academic dissertation.
- 32- Garber J.E., Offit K., Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol*. 2005 ; 23: 276-92.
- 33- Jones P.A., Laird P.W., Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*. 1999 ; 21: 163-7.

- 34-Bowne S.J., Williams A.C., Hague A., Butt A. J., Paraskeva C., Loss of APC protein expressed by human colonic epithelial cells and the appearance of a specific low molecular-weight form is associated with apoptosis in vitro. *Int J Cancer* 1994 ; 59:56–64.
- 35- Baeg G.H., Matsumine A., Kuroda T., Bhattacharjee R.N., Miyashiro I., Toyoshima K., Akiyama T., The tumor suppressor gene product APC blocks cell cycle progression from G0/G1 to S phase. *EMBO J* 1995 ; 14 : 5618–25.
- 36- Ilyas M., Staub J., Tomlinson I.P., Bodmer W.F., Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* 1999 ; 35 : 1986–2002.
- 37-Powell S.M., Zilz N., Beazer-Barclay Y., APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 1992 ; 359 : 235–7.
- 38- Hiltunen M.O., Alhonen L., Koistinaho J., Myohanen S., Paakkonen M., Marin S., Kosma V.M., Janne J., Hypermethylation of APC (adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1997 ; 70 : 644– 8.
- 39- Brabender J., Usadel H., Danenberg K.D., Metzger R., Schneider P.M., Lord R.V., Wickramasinghe K., Lum C.E., Park J., Salonga D., Singer J., Sidransky D., Hölscher A.H., Meltzer S.J., Danenberg P.V., Adenomatous polyposis coli gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer is associated with survival. *Oncogene* 2001; 20 : 3528–32.
- 40-Esteller M., Corn P.G., Baylin S.B., Herman J.G., A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61 : 322-59.
- 41- Esteller M., Sparks A., Toyota M., Sanchez-Cespedes M., Capella G., Peinado M.A., Gonzalez S., Tarafa G., Sidransky D., Meltzer S.J., Baylin S.B., Herman J.G., Analysis of Adenomatous Polyposis Coli Promoter Hypermethylation in Human Cancer. *Cancer Res*. 2000; 60 : 4366- 71.
- 42-Kawakami K., Ruzkiewicz A., Bennett G., Moore J., Grieu F., Watanabe G., Iacopetta B., DNA hypermethylation in the normal colonic mucosa of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2006 ; 94 : 593- 8.
- 43-Fearnhead N.S., Wilding J.L., Bodmer W.F., Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull*. 2002 ; 64 :27- 43.

- 44-Gaspar C., Fodde R., APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *Int J Dev Biol.* 2004 ; 48 : 377- 86.
- 45-Arnold C.N., Goel A., Niedzwiecki D., Dowell J.M., Wasserman L., Compton C., Mayer R.J., Bertagnolli M.M., Boland C.R., APC promoter hypermethylation contributes to the loss of APC expression in colorectal cancers with allelic loss on 5q. *Cancer Biol Ther.* 2004 ; 3: 960- 4.
- 46- Kuraguchi M., Wang X.P., Bronson R.T., Rothenberg R., Ohene-Baah N.Y., Lund J.J., Kucherlapati M., Maas R.L., Kucherlapati R., Adenomatous polyposis coli (APC) is required for normal development of skin and thymus. *PLoS Genet.* 2006 ; 2 : 146.
- 47-Sievers S., Fritzschn C., Lehnhardt M., Zahn S., Kutzner N., Kuhnen C., Muller O., Hypermethylation of the APC promoter but lack of APC mutations in myxoid/round-cell liposarcoma. *Int J Cancer.* 2006 ; 119 : 2347- 52.
- 48-Blaker H., Sutter C., Kadmon M., Otto H.F., Von Knebel-Doerberitz M., Gebert J., Helmke B.M., Analysis of somatic APC mutations in rare extracolonic tumors of patients with familial adenomatous polyposis coli. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004; 41: 93-8.
- 49- Dorudi S., Sheffield J.P., Poulson R., Northover J.M., Hart I.R., E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 1993;142 : 981- 6.
- 50- Schuhmacher C., Becker I., Oswald S., Atkinson M.J., Nekarda H., Becker K.F., Mueller J., Siewert J.R., Höfler H., Loss of immunohistochemical E-cadherin expression in colon cancer is not due to structural gene alterations. *Virchows Arch.* 1999 ; 434 : 489-95.
- 51--Rubinfeld B., Souza B., Albert I., Muller O., Chamberlain S.H., Masiarz F.R., Munemitsu S., Polakis P., Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science.* 1993; 262 : 1731- 4.
- 52- He T.C., Sparks A.B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K., Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998 ; 281 : 1509-12 .
- 53- Tetsu O., McCormick F., Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature.* 1999 ; 398 : 422–26.
- 54- Mann B., Gelos M., Siedow A., Hanski M.L., Gratchev A., Ilyas M., Bodmer W.F., Moyer M.P., Riecken E.O., Buhr H.J., Hanski C., Target genes of b-catenin-Tcell-

factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc. Natl Acad.* 1999 ; 96 :1603–08.

55-Willert K., Nusse R., β -catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Oncogenes and cell proliferation. Curr Opin Genet Dev.* 1998 ; 8 : 95-102.

56-Morin P.J., Sparks A.B., Korinek V., Barker N., Clevers H., Vogelstein B., Kinzler K.W., Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science.* 1997 ; 275 : 1787-90.

57-Park C.H., Hahm E.R., Lee J.H., Jung K.C., Rhee H.S., Yang C.H., Ionomycin downregulates beta-catenin / Tcf signaling in colon cancer cell line. *Carcinogenesis.* 2005 ; 26 : 1929-33.

58- Fearon E.R., Cho K.R., Nigro J.M., Kern S.E., Simons J.W., Ruppert J.M., Hamilton S.R., Preisinger A.C., Thomas G., Kinzler K.W., Identification of a chromosome 18 q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990 ; 247: 49-56.

59-Fearon E.R., Ekstrand B.C., Hu G., Pierceall W.E., Reale M.A., Bigner S.H., Studies of the deleted in colorectal cancer gene in normal and neoplastic tissues. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1994 ; 59 : 637- 43.

60-Akkiprik M., Ataizi-Celikel C., Düşünceli F., Sönmez O., Güllüodlu B.M., Sav A., Ozer A., Clinical significance of p53, K-ras and DCC gene alterations in the stage I-II colorectal cancers. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2007 ; 16 : 11-7.

61-Carethers J.M., Hawn M.T., Greenson J.K., Hitchcock C.L., Boland C.R., Prognostic significance of allelic loss at chromosome 18q21 for stage II colorectal cancer. *Gastroenterology.* 1998 ; 114 : 1188-95.

62-Nakatani K., Yoshimi N., Mori H., Sakai H., Shinoda J., Andoh T., Sakai N., The significance of the expression of tumor suppressor gene DCC in human gliomas. *J Neurooncol.* 1998 ; 40 : 237- 42.

63-Carvalho A.L., Chuang A., Jiang W.W., Lee J., Begum S., Poeta L., Zhao M., Jerónimo C., Henrique R., Nayak C.S., Park H.L., Brait M.R., Liu C., Zhou S., Koch W., Fazio V.M., Ratovitski E., Trink B., Westra W., Sidransky D., Moon C.S., Califano J.A., Deleted in colorectal cancer is a putative conditional tumor-suppressor gene inactivated by promoter hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2000 ; 66 : 9401-7.

64-Bamias A.T., Bai M.C., Agnantis N.J., Michael M.C., Alamanos Y.P., Stefanaki S.V., Razi E.D., Skarlos D.V., Kappas A.M., Pavlidis N.A. Prognostic significance of

the deleted in colorectal cancer gene protein expression in high-risk resected gastric carcinoma. *Cancer Invest.* 2000 ;21: 333- 40.

65-Mitomi H., Mori A., Kanazawa H., Nishiyama Y., Ihara A, Otani Y., Sada M., Kobayashi K., Igarashi M., Venous invasion and down-regulation of p21(WAF1/CIP1) are associated with metastasis in colorectal carcinomas. *Hepatogastroenterology.* 2005 ; 52: 1421-6.

66- Sezgin İ., 1998, *Klinik Genetik. Cumhuriyet üniversitesi yayınları.* No:70 221-5, Sivas.

67-Gryfe R., Swallow C., Bapat B., Redston M., Gallinger S., Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer.* 1997 ; 21: 233-300.

68-Bouzourene H., Gervaz P., Cerottini J.P., Benhattar J., Chaubert P., Saraga E., Pampallona S., Bosman F.T., Givel J.C., p53 and Ki-ras as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2000 ; 36 : 1008-15.

69- Elgin S. C. R., 1995, *Chromatin Structure and Gene Expression*, Oxford University Press Walton Street, New York. chapter 1.

70- Pass H. I., Mitchell J. B., Jhonson D. H., Turrisi T. A., 1996, *Lung Cancer Principles and Practice.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia- New York, p: 73-284.

71-Ruas M., Peters G., The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta.* 1998 ; 1378 : 115-77.

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

73- Neuhausen S.L., Swensen J., Miki Y., Liu Q., Tavtigian S., Shattuck-Eidens D., Kamb A., Hobbs M.R., Gingrich J., Shizuya H. A P1-based physical map of the region from D17S776 to D17S78 containing the breast cancer susceptibility gene BRCA1. *Hum Mol Genet.* 1994 ; 3: 1919-26.

74-Tycko B. Epigenetic gene silencing in cancer. *J Clin Invest.* 2000; 105: 401-7.

75-Modrich P., Lahue R., Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem.* 1996 ; 65: 101-33.

76-Kane M.F., Loda M., Gaida G.M., Lipman J., Mishra R., Goldman H., Jessup J.M., Kolodner R. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of

hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997; 57: 808-11.

77-Herman J.G., Umar A., Polyak K., Graff J.R., Ahuja N., Issa J.-P.J., Markowitz S., Wilson J.K.V., Hamilton S.R., Kinzler K.W., Kane M.F., Kolodner R.D., Vogelstein B., Kunkel T.A., Baylin S.B., Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1998 ; 98 : 6870 –75.

78-Deng G., Chen A., Hong J., Chae H.S., Kim Y.S., Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res.* 1999 ; 59: 2029-33.

79- Corman M.L., Allison S.I., Kuehne J. P., 2002, *Handbook of Colon & Rectal Surgery* by Lippincott Williams & Wilkins, 530 Walnut street, Philadelphia, PA 196 USA. p: 398- 406.

80-Narayan S., Roy D., Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer.* 2003 ; 12 : 41. Review.

81- Nowell P.C., Hungerford D.A., A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science.* 1960 ; 132 : 1497.

82- Dal Cin P., Sandberg A.A., Chromosomal aspects of human oncogenesis 1989; 1:113-6.

83- Sandberg A.A., *The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia*, 1990, 2nd ed., Elsevier, New York.

84- Mitelman F., *Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer.* 1995, 5th ed., Wiley-Lis, New York.

85- Mitelman F., Heim S., Chromosome abnormalities in cancer. *Cancer Detect Prevent.* 1990 ; 14 : 527-37.

86- Nowell P.C. , Cytogenetics of tumor progression. *Cancer* 1990 ; 65 : 2172-7.

87- Cowel J.K., Double minutes and homogenously staining regions: Gene amplification in mammalian cells. *Ann Rev Biochem* 1982 ; 16 : 21-59.

88- Stark G.R., Wahl G.M., Gene amplification. *Ann Rev Biochem* 1984 ; 53 : 448-91.

89- Mitelman F. , Clustering of breakpoints to specific chromosomal regions in human neoplasia: A survey of 5345 cases. *Hereditas* 1986 ; 104 : 113-9.

90- Foulds L., Tumor progression. *Cancer Res* 1957 ; 17 : 355-6.

- 91- Solomon E., Borrow J., Goddard A.D., Chromosome aberrations and cancer. *Science* 1991 ; 254 : 1153- 60.
- 92-Wang L., Li L., Zhou H.Y., Gao X.K., Li S.J., t(13q;17p) and del(5q): possibly specific changes in Chinese patients with colorectal cancers. *Cancer Genet Cytogenet.* 1992 ; 62 : 191-6.
- 93-Poeaim S., Rerkamnuaychoke B., Jesdapatarakul S., Campiranon A., Chromosome alterations in colorectal cancer in Thai patient. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005; 160:152-9.
- 94-He Q.J., Zeng W.F., Sham J.S., Xie D., Yang X.W., Lin H.L., Zhan W.H., Lin F., Zeng S.D., Nie D., Ma L.F., Li C.J., Lu S., Guan X.Y., Recurrent genetic alterations in 26 colorectal carcinomas and 21 adenomas from Chinese patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003 ; 144 : 112-8 .
- 95-Countryman P., Heddle J., The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res.* 1976 ; 41: 321-32.
- 96-Demirel S., Zamani A., Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 2002 ; 12 : 123-7.
- 97- Fenech M., Chang W.P., Krisch Volders M., Holland N., Bonnassi S., Zeiger E., HUMN Project:detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutat.Res.* 2003; 534 : 65-75.
- 98- Fenech M., The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 2000; 455: 81-95.
- 99- Waddington C.H.,The epigenotype. *Endeavour* 1942; 1: 18-20.
- 100-Kawasaki H., Taira K., Morris K.V., siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Cell Cycle.* 2005 ; 4: 442-8.
- 101-Van Vliet J., Oates N.A., Whitelaw E., Epigenetic mechanisms in the context of complex diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Apr 27.
- 102- Li E., Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 2002 ; 3: 662-73.
- 103- Elgin S. C. R., 1995, *Chromatin Structure and Gene Expression*, Oxford University Press Walton Street, New York. chapter 7.
- 104-Esteller M., Herman J.G., Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol.* 2002 ; 196 : 1-7.
- 105-Jones P.A., Baylin S.B.,The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002 ; 3: 415-28.

- 106-Esteller M., CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*. 2002 ; 21: 5427-40.
- 107-Lind G.E., Thorstensen L., Løvig T., Meling G.I., Hamelin R., Rognum T.O., Esteller M., Lothe R.A., A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer*, 2004 ; 3: 28.
- 108- Latchman D., 1995, Transcriptional control- chromatin structure, Gene Regulation, A Eukaryotic Perspective, second editon, Chapman & Hall, London, p : 122- 5.
- 109-DU T.T., Huang Q.H., The roles of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Yi Chuan*, 2007 ; 29 : 387-92.
- 110- Waggoner D., Mechanisms of Disease : Epigenesis. *Semin Pediatr Neurol*. 2007 ;14: 7-14.
- 111-Razin A., Riggs A.D., DNA methylation and gene function. *Science*. 1980 ; 210: 604-10.
- 112-Bestor T.H., Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J*. 1992 ; 11 : 2611-7.
- 113-Heby O., DNA methylation and polyamines in embryonic development and cancer. *Int J Dev Biol*. 1995 ; 39 : 737-57.
- 114- Özdemir Ö., Eğilmez R., Arıkan G., Gökçe G., Korkmaz M., Ayan S., Gültekin Y., Renal hücreli karsinomlarda K-ras exon 2 mutasyonu ve DNA hipometilasyonu *Türk Neoplazi Dergisi*. 1997; 7: 1.
- 115-Huang T.H., Laux D.E., Hamlin B.C., Tran P., Tran H., Lubahn D.B., Identification of DNA methylation markers for human breast carcinomas using the methylation-sensitive restriction fingerprinting technique. *Cancer Res*. 1997 ; 57 : 1030- 4.
- 116-Singal R., Ginder G.D., DNA methylation. *Blood*. 1999 ; 93 : 4059-70.
- 117-Belinsky S.A., Nikula K.J., Baylin S.B., Issa J.P., A microassay for measuring cytosine DNA methyltransferase activity during tumor progression. *Toxicol Lett*. 1995; 82-83: 335- 40.
- 118- Hotchkiss R.D., The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem* 1948 ; 175: 315-32.
- 119-Cooper D.N., Eukaryotic DNA methylation. *Hum Genet*. 1983 ; 64: 315-33.
- 120-Michalowsky L.A., Jones P.A., DNA methylation and differentiation. *Environ Health Perspect*. 1989 ; 80 : 189-97.

- 121-Vaniushin B.F., DNA methylation and epigenetics. *Genetika*. 2006 ; 42: 1186-99.
- 122-Selten G., Cuypers H.T., Zijlstra M., Melief C., Berns A. Involvement of c-myc in MuLV-induced T cell lymphomas in mice: frequency and mechanisms of activation. *EMBO J*. 1984 ; 3: 3215-22.
- 123-Potter J.D., Methyl Supply, Methyl Metabolizing Enzymes and Colorectal Neoplasia. *J Nutr*. 2002 ;132 : 2410-12.
- 124-Chen J., Giovannucci E., Kelsey K., Rimm E.B., Stampfer M.J., Colditz G.A., Spiegelman D., Willett W.C., Hunter D.J., A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res*. 1996 ; 56: 4862- 4.
- 125-Bott C., Lembcke B., Stein J., Colorectal cancer and folate. *Z Gastroenterol*. 2003; 41: 263-70.
- 126-Ulrich C.M., Kampman E., Bigler J., Schwartz S.M., Chen C., Bostick R., Fosdick L., Beresford S.A., Yasui Y., Potter J.D., Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism: evidence for gene-environment interaction? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 ; 8 : 659-68.
- 127-Cravo M., Fidalgo P., Pereira A.D., Gouveia-Oliveira A., Chaves P., Selhub J., Mason J.B., Mira F.C., Leitao C.N., DNA methylation as an intermediate biomarker in colorectal cancer: modulation by folic acid supplementation. *Eur J Cancer Prev*. 1994 ; 3 : 473-9
- 128-Kim Y.I. , Baik H.W., Fawaz K., Knox T., Lee Y.M., Norton R., Libby E., Mason J.B., Effects of folate supplementation on two provisional molecular markers of colon cancer: a prospective, randomized trial. *Am J Gastroenterol*. 2001 ; 96 : 184-95.
- 129-Karpf A.R., Jones D.A., Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogene*. 2002 ; 21 : 5496-503.
- 130- Momparler R. L. , Bovenzi V., DNA Methylation and Cancer. *Journal of cellular physiology* 2000 ; 183 : 145- 54. Review
- 131- Schulz W. A., 2005, *Cancer Epigenetics, Molecular Biology of Human Cancers*, Springer, Netherlands, p: 178-179.
- 132-Ehrlich M., The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. *Clin Immunol* 2003 ; 109 : 17-28.
- 133-Suijkerbuijk K.P., van der Wall E., van Laar T., Vooijs M., van Diest P.J. Epigenetic processes in malignant transformation: the role of DNA methylation in cancer development. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2007 ; 151: 907-13.

- 134-Klimasauskas S., Kumar S., Roberts R.J., Cheng X., HhaI methyltransferase. flips its target base out of the DNA helix. *Cell*. 1994 ; 76 : 357-69.
- 135-Bourc'his D., Xu G.L., Lin C.S., Bollman B., Bestor T.H., Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*. 2001 ; 294 : 2536-9.
- 136-Atay Ç., Argüden Y.T., 2006, Kanser oluşumunda rol oynayan epigenetik mekanizmalar, II. Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi ve V. Tıbbi Biyolojik Bilimler Öğrenci Sempozyumu, oturum 1, İstanbul, 26-27 Mayıs 2006, Erişim: www.ctf.edu.tr/kongre2006/kongre-programi.
- 137- Elgin S. C. R., 1995, Chromatin Structure and Gene Expression, Oxford University Press Walton Street, New York.chapter 10.
- 138-. Cottrell S. E., Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology. *Clinical Biochemistry* 2004 ; 37: 595– 604. Review
- 139-Gaudet F., Hodgson J.G., Eden A., Jackson-Grusby L., Dausman J., Gray J.W., Leonhardt H., Jaenisch R., Induction of Tumors in Mice by Genomic Hypomethylation *Science*. 2003 ; 300 : 489-92.
- 140-Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B., DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 ; 94 : 2545-50.
- 141-Chen R.Z., Pettersson U., Beard C., Jackson-Grusby L., Jaenisch R., DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*. 1998 ; 395: 89-93.
- 142- Latchman D., 1995, Transcriptional control- chromatin structure, Gene Regulation, A Eukaryotic Perspective, second editon, Chapman & Hall, London, p: 116-122.
- 143-Hoyer D., RNA interference for studying the molecular basis of neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2007; 10 : 122-9.
- 144-Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M., Iorio M.V., Ferracin M., Shimizu M., Wojcik S.E., Aqeilan R.I., Zupo S., Dono M., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C.G., Kipps T.J., Negrini M., Croce C.M., miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 ; 102 :13944-9.
- 145-Costinean S., Zanesi N., Pekarsky Y., Tili E., Volinia S., Heerema N., Croce C.M., Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 ; 103 : 7024-9.
- 146-Zhu S., Si M.L., Wu H., Mo Y.Y., MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*. 2007 ; 282 : 14328-36.

- 147- Özdemir Ö., Kanser gelişiminde DNA metilasyonunun moleküler etkisi Sendrom, 1999.
- 148- Singer-Sam J., Grant M., LeBon J.M., Okuyama K., Chapman V., Monk M., Riggs A.D., Use of a HpaII-Polymerase Chain Reaction Assay To Study DNA Methylation in the Pcg-1 CpG Island of Mouse Embryos at the Time of X-Chromosome Inactivation. *Mol Cell Biol.* 1990 ; 10 : 4987-9.
- 149- Park J. G, Chapman V. M., CpG island promoter region methylation patterns of the inactive-X-chromosome hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hprt) gene. *Mol Cell Biol.* 1994 ; 14 : 7975–83.
- 150- Akın H., Özkınay F., Genomik İmprinting, Uniparental Dizomi, Mikrodelesyon Sendromları. *Turkiye Klinikleri J Pediatr Sci* 2005 ; 1 : 61-7.
- 151- Rodenhiser D., Mann M., Epigenetics and human disease: Translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 2006 ; 174 : 341-48 .
- 152- Verona R.I., Mann M.R., Bartolomei M.S., Genomic imprinting: intricacies of epigenetic regulation in clusters. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003 ; 19: 237-59.
- 153- Delaval K., Feil R., Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004 ; 14: 188-95.
- 154- Nicholls R.D.,Knepper J.L.,Genome organization, function, and imprinting in Prader–Willi and Angelman syndromes.*Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2:153-75.
- 155- Weksberg R., Smith A.C., Squire J., Beckwith–Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet* 2003 ; 12 : 61-8.
- 156- Hitchins M.P., Stanier P.,Preece M.A., Silver–Russell syndrome: a dissection of the genetic aetiology and candidate chromosomal regions. *J Med Genet* 2001; 38 : 810-9.
- 157- Ballestar E., Etseller M., Richardson B.C., The epigenetic face of systemic lupus erythematosus. *Carcinogenesis.* 2006 ; 27 : 1121-5.
- 158- Gartler S.M., Hansen R.S., ICF syndrome cells as a model system for studying X chromosome inactivation. *Cytogenet Genome Res.* 2002 ; 99 : 25-9.
- 159- Kriaucionis S., Bird A., DNA methylation and Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 2003 ; 12 : 221-7.
- 160- Gibbons R.J., McDowell T.L., Raman S., O'Rourke D.M., Garrick D., Ayyub H., Higgs D.R., Mutations in ATRX, encoding a SWI/ SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet* 2000 ; 24: 368-71.

- 161- Tupler R., Gabellini D., Molecular basis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci* 2004 ; 61: 557-66.
- 162-Tsien F., Sun B., Hopkins N.E., Vedanarayanan V., Figlewicz D., Winokur S., Ehrlich M., Methylation of the FSHD Syndrome-Linked Subtelomeric Repeat in Normal and FSHD Cell Cultures and Tissues *Mol Genet Metab.* 2001;74: 322-31.
- 163-Esteller M., The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis.* 2006 ; 27 : 1121-5.
- 164-Costa T., Greer W., Rysiecki G., Buncic J.R., Ray P.N., Monozygotic twins discordant for Aicardi syndrome. *J Med Genet.* 1997; 34: 688-91.
- 165- Richardson B. C., Role of DNA Methylation in the Regulation of Cell Function: Autoimmunity, Aging and Cancer. *J. Nutrition* 2002; 132: 2401-05.
- 166-Sekigawa I., Kawasaki M., Ogasawara H., Kaneda K., Kaneko H., Takasaki Y., Ogawa H., DNA methylation: its contribution to systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Med.* 2006 ; 6: 99-106.
- 167-Yu R.C., Hsu K.H., Chen C.J., Froines J.R., Arsenic Methylation Capacity and Skin Cancer. *Cancer Epidemiol. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000 ; 9 : 1259-62.
- 168- Counts, J. L., and Goodman, J. I., Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell.* 1995 ; 83: 13–15.
- 169-Robertson K.D., Jones P.A., DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis.* 2000 ; 21: 461-7.
- 170-Esteller M., Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007; 8: 286-98.
- 171-Lewin J., Plum A., Hildmann T., Rujan T., Eckhardt F., Liebenberg V., Lofton-Day C., Wasserkort R., Comparative DNA methylation analysis in normal and tumour tissues and in cancer cell lines using differential methylation hybridisation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007 Mar 15. Baskıda.
- 172- Herranz M., Etseller M., New therapeutic targets in cancer: The epigenetic connection. *Clinical and Translational Oncology,* 2006 ; 8: 242–49.
- 173-Nishisho I., Nakamura Y., Miyoshi Y., Miki Y., Ando H., Horii A., Koyama K., Utsunomiya J., Baba S., Hedge P., Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science.* 1991; 253: 665-9.
- 174-Vincent A., Perrais M., Desseyn J.L., Aubert J.P., Pigny P., Van Seuningen I., Epigenetic regulation (DNA methylation, histone modifications) of the 11p15 mucin

- genes (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) in epithelial cancer cells. *Oncogene*. 2007 Apr 30. Baskıda
- 175-Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S., Nelkin B.D., Baylin S.B., Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 ; 93 : 9821-6.
- 176- Herman J.G., Latif F., Weng Y., Lerman M.I., Zbar B., Liu S., Samid D., Duan D.-S.R., Gnarr J.R., Linehan W.M., Baylin,S.B., Silencing of the VHL Tumor-Suppressor Gene by DNA Methylation in Renal Carcinoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1994 ; 91: 9700– 4.
- 177-Florl AR, Franke KH, Niederacher D, Gerharz CD, Seifert HH, Schulz WA., DNA Methylation and the Mechanisms of CDKN2A Inactivation in Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder. *Lab Invest*. 2000 ; 80 : 1513-22
- 178-Dobosy J.R., Roberts JL, Fu VX, Jarrard DF., The expanding role of epigenetics in the development, diagnosis and treatment of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J Urol*. 2007 ; 177 : 822-31.
- 179-Konstantinopoulos P.A., Karamouzis M.V., Papavassiliou A.G., Focus on acetylation: the role of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy and beyond. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007 ; 16: 569-71
- 180-Laird P.W., Jackson-Grusby L., Fazeli A., Dickinson S.L., Jung W.E., Li E., Weinberg R.A., Jaenisch R., Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell*. 1995 ; 81: 197-205.
- 181-Rodenhiser D., Mann M., Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications . *CMAJ* 2006 ; 174.
- 182- Orcan S., 2006, Epigenetik ve Epigenomik. Erişim: <http://yunus.hacettepe.edu.tr>.
- 183-Momparler R.L., Bovenzi V., DNA Methylation and Cancer. *J Cell Physiol*. 2000;183:145-54.
- 184-Lieb J.D. , Beck S., Bulyk M.L., Farnham P., Hattori N., Henikoff S., Liu X.S., Okumura K., Shiota K., Ushijima T., Grealley JM., Applying whole-genome studies of epigenetic regulation to study human disease. *Cytogenet Genome Res*. 2006 ; 114: 1-15.
- 185-Grigg G., Clark S., Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *Bioessays*. 1994 ; 16 : 431-6.

- 186- Hayatsu H., Wataya Y., Kai K., Iida S., Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine and their derivatives. *Biochemistry* 1970 ; 9 : 2858–66.
- 187- Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Molloy P.L., Paul C.L., A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 1827–31.
- 188- Ogino S., Kawasaki T., Brahmandam M., Cantor M., Kirkner G.J., Spiegelman D., Makrigiorgos G.M., Weisenberger D.J., Laird P.W., Loda M., Fuchs CS., Precision and performance characteristics of sodium bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. *J Mol Diagn* 2006 ; 8 : 209-17.
- 189- Jones P.A., Martienssen R., A blueprint for a Human Epigenome Project: the AACR Human Epigenom Workshop. *Cancer Res*. 2005 ; 65 : 11241-6.
- 190- Rauscher FJ 3rd., It is time for a Human Epigenome Project. *Cancer Res.*, 2005; 65: 11229.
- 191- Garber K., Momentum building for human epigenome project. *J. Natl Cancer Inst*. 2006; 98 : 84–6.
- 192- Esteller M, Herman JG., Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol*. 2002 ; 196 : 1-7.
- 193- Frigola J., Solé X., Paz M.F., Moreno V., Esteller M., Capellà G., Peinado M.A., Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer *Hum Mol Genet*. 2005 ; 14 : 319-26.
- 194- Oakes C.C., La Salle S., Smiraglia D.J., Robaire B., Trasler J.M., Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev Biol*. 2007 May 8. Baskida.
- 195- Khulan B., Thompson R.F., Ye K, Fazzari M.J., Suzuki M., Stasiek 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., Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay. *Genome Res*. 2006 ; 16 :1046-55.
- 196- Bedford M.T., van Helden P.D., Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate. *Cancer Res*. 1987 ; 47 : 5274- 6.
- 197- Wahlfors J., Hiltunen H., Heinonen K., Hamalainen E., Alhonen L., Janne J., Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1992; 80: 2074-80.

- 198-Lin C.H., Hsieh S.Y., Sheen I.S., Lee W.C., Chen T.C., Shyu W.C., Liaw Y.F., Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res.* 2001; 61: 4238-43.
- 199-Kim Y.I., Giuliano A., Hatch K.D., Schneider A., Nour M.A., Dallal G.E., Selhub J., Mason J.B., Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer*, 1994 ;74 : 893-9.
- 200-Qu G., Dubeau L., Narayan A., Yu M.C., Ehrlich M., Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutat Res.* 1999 ; 423 : 91-101.
- 201- Santourlidis S., Florl A., Ackermann R., Wirtz H.C., Schulz W.A., High frequency of alterations in DNA methylation in adenocarcinoma of the prostate. *Prostate* 1999 ; 39 : 166-74.
- 202-Shen L., Fang J., Qiu D., Zhang T., Yang J., Chen S., Xiao S., Correlation between DNA methylation and pathological changes in human hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 1998 ; 45 : 1753-9.
- 203-Lin CH., Hsieh S.Y., Sheen I.S., Lee W.C., Chen T.C., Shyu W.C., Liaw Y.F. Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res.* 2001; 61: 4238-43.
- 204-Soares J., Pinto A.E., Cunha C.V., André S., Barao I., Sousa J.M., Cravo M., Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression. *Cancer.* 1999 ; 85 : 112-8.
- 205-Feinberg A.P., Gehrke C.W., Kuo K.C., Ehrlich M., Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res.* 1988 ;48 : 1159-61.
- 206-Ribieras S., Song-Wang X.G., Martin V., Lointier P., Frappart L., Dante R. Human breast and colon cancers exhibit alterations of DNA methylation patterns at several DNA segments on chromosomes 11p and 17. *J Cell Biochem.* 1994 ; 56 : 86-96.