



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLOREKTAL KANSERLERE EPİGENETİK YAKLAŞIM; APC
TÜMÖR SUPRESÖR GEN FONKSİYON ANALİZLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Hazırlayan

Bio. Ebru Şık

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Öztürk Özdemir

ÇANAKKALE-2014



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**KOLOREKTAL KANSERLERE EPIGENETİK YAKLAŞIM; APC
TÜMÖR SUPRESÖR GEN FONKSİYON ANALİZLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

Hazırlayan

Bio. Ebru Şık

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Öztürk Özdemir

ÇANAKKALE-2014

TEZ ONAY FORMU

Kurum Adı : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program Adı :

Programın Seviyesi :Yüksek Lisans () Doktora ()

Anabilim Dalı :

Tez Sahibi Adı ve Soyadı:

Tez Başlığı :

Sınav Yeri :

Sınav Tarihi :

Yukarıda tanıtımı yapılan tez, Tez Sınav Jürisi tarafından okunmuş, kapsam ve kalite yönünden başarılı bulunarak Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Sınav Jürisi

Danışman (Unvan ve Adı)	Kurumu	İmza
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan ve Adları)		

Tez sınav jürisi tarafından başarılı olarak kabul edilen Yüksek Lisans/Doktora Tezi Enstitü Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

THESIS APPROVAL FORM

Institute Name : Çanakkale Onsekiz Mart University Institute of Health Sciences

Programme Name :

Programme Level : Master of Science () Doctor of Philosophy ()

Department :

Student Name and Surname: :

Title of the Thesis :

Examination Place :

Examination Date :

We have investigated the present thesis in regard to content and quality and have approved

as a Master of Science / Doctor of Philosophy Thesis.

Supervisor (Title and Name)	Institution	Signature
Members of Examination Jury (Titles and Names)		

The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Health Science Institute, Canakkale Onsekiz Mart University, with decision dated and numbered

BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8'de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

Tarih: 18/06/2014

Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Ebru ŞIK

İmza:

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans'a daha ilk başladığım andan itibaren, ince fikirliliği, duyarlılığı ile her anlamda en büyük destekçim olan, hayata karşı pozitif bakışı ve akademik yönü ile tam bir bilim adamı olan, hayatım boyunca bilimselliğini, yapıcı ve yaratıcı düşünme şekli ile davranışlarını örnek almaya çalışacağım, bana verdiği emeklerini hiçbir zaman unutmayacağım çok değerli tez danışman hocam Sayın Prof.Dr. Öztürk ÖZDEMİR'e,

Yüksek lisans ve tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, hoşgörü ve ilgisiyle daima yanımda olan birbirinden değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Fatma SILAN'a ve Yrd. Doç.Dr. Ahmet ULUDAĞ'a

Gerek tıbbi gerekse sosyal alanlarda eşsiz deneyimlerini benimle paylaşan, sabrını, içtenliğini ve desteğini her an hissettiğim Asistan Dr. Mine URFALI'ya

Şuan yanımda olmayan, ancak uzmanlık eğitimi boyunca edindiği klinik tecrübelerini benimle paylaşan çok içten ve hayat dolu kişiliğiyle beni her zaman motive ettiği için Uzman Dr. Sinem YALÇINTEPE'ye,

Burada ikinci ailem olan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Genetik Laboratuvarında birlikte çalışmaktan gurur duyduğum, göstermiş oldukları hassasiyet, anlayış ve her türlü destekleri için Tekniker Şengül TÜRÜNZ, Biyolog Özlem DEĞİRMENCİ ALBAYRAKOĞLU, Biyolog Didem UYSAL'a, Kimyager Hülya HAS, Kimyager Duygu KANKAYA ve tüm genetik ailesine,

İyi ve kötü, her anlamda yanımda olan, bana sonsuz destek veren, en kötü anlarımda beni mutlu edebilen ve yüzümü güldürebilen, zor ve stresli geçen bu yolda göstermiş olduğu sıcacık sevgi ve şefkatinden dolayı canım ablam Hatice ŞIK'a

Hayatımın her saniyesinde sorgusuz ve koşulsuz desteklerini hissettiğim, beni ben yapan öğelerin mimarları, en zor anlarımda beni yüreklendirerek aydınlığa çıkararak ve haklarını asla ödeyemeyeceğim canım annem Nejla ŞIK ve canım babam Yusuf İzzettin ŞIK'a en içten duygularıyla sonsuz teşekkürler.

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Proje No: 277 olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
	NO
ÖZET	I
SUMMARY	II
İÇİNDEKİLER	III
KISALTMA VE SİMGELER	IV
TABLO VE ŞEKİLLER	V
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	6
2.1. KANSER	6
2.1.1. Tümör Gelişimi	8
2.1.1.1.Onkogenler (proto-onkogenler)	9
2.1.1.2.Tümör Supresör Genler	10
2.1.1.2.1. Hücre Yüzeyinde Etkili olan Tümör Supresör Genler	10
2.1.1.2.2. Uyarı İletim Sistemini Düzenleyen Tümör Supresör Genler	11
2.1.1.2.3. Çekirdekte Etkili olan Tümör Supresör Genler	11
2.1.1.3. Heterozigosite Kaybı (LOH)	13
2.1.1.4. Hatalı Eşleşme Onarım Genleri (MMR)	13
2.1.1.5. Telomeraz Aktivitesi	14
2.1.1.6. Epigenetik Değişimler	14
2.2. KOLOREKTAL KANSER	16
2.2.1. Kolorektal Kanser Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi	17
2.2.2. Genetik Faktörler	17
2.2.3. Çevresel Faktörler	20
2.2.4. Kolorektal Kanser Histolojik Yapı ve Patoloji	21
2.3. KOLOREKTAL KARSİNOGENEZ	23
2.3.1. Kolorektal Karsinogenezisin Moleküler Mekanizması	23
2.3.1.1. Adenom-Karsinom Ardışıklığı	23
2.3.1.2. Kolorektal Karsinogenezde Moleküler Ara Yollar	24
2.3.1.2.1. Kromozomal İnstabilite (CIN) Ara Yolu	25
2.3.1.2.2. Mirosatellit İnstabilitesi (MSI) Ara Yolu	27
2.3.1.2.3. CPG Adası Metilasyon Fenotipi (CIMP) Ara Yolu	29

2.4. KOLOREKTAL KANSERDE EVRELEME	29
3. KANSER VE EPIGENETİK	33
3.1. Epigenetik Mekanizmalar	35
3.1.1. Transkripsiyonel Mekanizmalar	36
3.1.1.1. Histon Modifikasyonları	36
3.1.1.2. DNA Metilasyonu	37
3.1.1.2.1. DNA Metilasyonunun Görevi	39
3.1.1.2.2. DNA Metilasyonu ile Gen İfadesinin Düzenlenmesi	40
3.1.1.2.3. DNA Metilasyonunu Gerçekleştiren Enzimler	40
3.1.1.3. Tümör Baskılayıcı Genlerin Promotor Bölgelerinin Metilasyon profili	42
3.2. APC (Adenomatous polyposis coli) Geni	43
3.2.1. APC Geni Promotor Metilasyonu	45
3.2.2. APC Geni ve Beta-kateninin WNT sinyalindeki Rollerini	45
4. MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) Tekniği	46
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER	51
5.1. Çalışma Şekli ve Hasta Grubu	51
5.1.1. Hasta Seçimi	51
5.1.2. Kullanılan gereçler	52
5.1.3. Kullanılan kimyasal malzemeler	52
5.2. YÖNTEMLER	53
6. BULGULAR	61
7. TARTIŞMA	71
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	79
9. KAYNAKLAR	81
10. ÖZGEÇMİŞ	89
11. EKLER	91

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

APC	: Adenomatous Polyposis Coli (Adenomatöz Polipozis Koli)
AJCC	: American Joint Committee on Cancer (Amerikan Kanser Birliği)
BT	: Bilgisayarlı tomografi
C	: Cytosine (Sitozin)
cm	: Santimetre
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CIN	: Kromozomal instabilite
CIMP	: CpG adası metilator fenotip
COX-2	: Siklooksijenaz-2
dk	: Dakika
DCC	: Deleted in Colorectal Cancer (Kolorektal Kanserde Silinmiş)
CRC	: Colorectal Cancer (Kolorektal Kanser)
CpG	: Cytosine Phosfo Guanin (Sitozin Fosfo Guanin)
DNA	: Deoksiribonükleikasit
DNMT	: DNA Metil Transferaz
ERUS	: Endorektal ultrasonografi
FAP	: Familial Adenomatous Polyposis (Ailesel Adenomatöz Poliposis Koli)
G	: Guanin
HhaI enzyme	: HhaI Restriksiyon endonükleaz enzimi
HNPCC	: Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Kalıtsal Polipsis Kolorektal Kanser)
K-ras	: Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
KRK	: Kolorektal Karsinoma
kb	: Kilo baz
LOH	: Loss of Heterozygosity (Heterozigosite Kaybı)
MGMT	: O ⁶ -Metil Guanin DNA-metiltransferaz
MLH2	: MutL Homolog 1
MMR	: Hatalı Eşleşme Tamir genleri (Mismatch Repair Genes)
MSH6	: Mut S Homolog 6
MBD	: Metile Bağlanma Domaini

MSI	: Microsatellit Instability (Mikrosatellit Düzensizlik)
MS-PCR	: Metilasyon Spesifik PCR
MS MLPA	: Metilasyon Spesifik Multipleks Ligasyon Esaslı Prob Amplifikasyonu
mRNA	: Messenger RNA (Haberci RNA)
µl	: Mikrolitre
mg	: Mikrogram
MLPA	: Multiplex Ligation dependent Probe Amplification
NER	: Nükleotide Excision Repair (Nükleotit Kesip Çıkarma Tamiri)
nt	: Nükleotid
ng	: Nanogram
PCR	: Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RE	: Restrüksiyon Endonükleaz
RNA	: Ribonükleikasit
sn	: Saniye
TSG	: Tümör Süpressör Gen
TNM	: Tümör Nod Metastazı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO

- Şekil 1.** Kalın barsak iç zarındaki normal kolonik hücrenin (A), anormal çoğalması ile zaman içerside poliplere ve kansere hücrelerine (D), dönüşümünü gösteren bir seri basamak. 3
- Şekil 2.** Hhal enzim kesim reaksiyonu sonucunda metillenme söz konusu olduğunda enzim kesim bölgesi kesimden korunmuştur dolayısıyla kesim gerçekleşmeyip TSG'lerden sinyal elde edilmiştir. Çalışmamızda hasta bireylerde değerlendirilen TP53, MSH6 ve APC TSG'lerin metilasyon varlığında genlerde meydana gelen sessizleşme ve inaktivasyon analizi. 4
- Şekil 3.** Sağlıklı kontrol bireye ait periferik kan dokusundan elde tümör dokusuna ait bir adet enzim kesimine maruz kalmayan normal MLPA reaksiyonu (A), Hhal enzimine maruz bırakılan Metilasyon reaksiyonu (B) ile eş zamanlı gerçekleştirilen iki reaksiyondur. Her bir TSG promoter metilasyon profillerinin 0,5-1,5 oransal değerleri arasında normalizasyonu (C). 5
- Şekil 4.** Kolorektal karsinogeneze etyolojik yaklaşım. 20
- Şekil 5.** Adenom karsinom ardışığı; normal kolon epitelinin karsinoma dönüşümünde bir seri mutasyon. 24
- Şekil 6.** Wnt/ β -katenin sinyal mekanizması. 26
- Şekil 7.** CpG metilasyon mekanizması, (A) Sitozin bazındaki nükleotidleri içeren CpG adacığı, (B) DNMT'lar tarafından katalizlenen CpG adası metilasyonu; S-adenozil metiyonin (SAM-CH₃)'den sitoz bazına metil grubu transferi. 38
- Şekil 8.** Sitozin bazında genomik DNA metilasyonu ve demetilasyonu. 42
- Şekil 9.** İnsan 5. kromozomu üzerinden APC geninin yerleşiminin gösterilmesi. 44
- Şekil 10.** APC gen şeması. 46
- Şekil 11.** MLPA probleminin hedef bölgelerinde hibride olması ve ligasyonu. 48

- Şekil 12.** MLPA yöntemi ile metilasyon durumunun belirlenmesini sağlayan tekniğin basamakları. 49
- Şekil 13.** Metil spesifik MS-MLPA tekniği çalışma prensibi. **A.** Hipermetile hedef gende ligasyon sonrası CpG dinükleotidte sitozin metil taşıdığı için primer sonrası *HhaI* restriksiyon enzimi özgülüğünü kaybeder ve gen bölgesi amplifiye olabilecektir. MLPA analizinde hem kopya sayısında ve hemde metilasyon analizinde pik elde edilir. **B.** Hipometile hedef gende ligasyon sonrası CpG dinükleotidte sitozin metil taşımadığı için primer sonrası *HhaI* restriksiyon enzimi primer dizilerini (primer, prob ve kalıp DNA kompleki) kırar prob amplifikasyonu yapılamaz. MLPA analizinde hem kopya sayısı ve hemde metilasyon analizinde pik elde edilemez. 54
- Şekil 14.** *HhaI* enzimi metilasyon duyarlı çalışma mekanizmasına ilgili genin tanıma bölgesinde metilasyon varlığında enzim kesim bölgesi. 57
- Şekil 15.** Araştırmadaki hasta bireye ait tümör dokusundan genomik DNA'nın hedef gen analiz profilleri değerlendirilmektedir. Dört adet PCR kontrol (**A**), beş adet cinsiyet kontrol (**B**), genleri aktif durumda olan erkek (46, XY) birey. Hedef 37 adet tümör supresör ve housekeeping genlerinden TP53, MSH6 ve APC inaktif (hipermetile) olduğu MS-MLPA tekniği ile ortaya konmuştur (**C**). 65
- Şekil 16.** Araştırmadaki hasta bireye ait tümör dokusundan genomik DNA'nın hedef gen analiz profilleri değerlendirilmektedir. Dört adet PCR kontrol (**A**), beş adet cinsiyet kontrol (**B**), genleri aktif durumda olan erkek (46, XY) birey. Hedef 37 adet tümör supresör ve housekeeping genlerinden MSH6 ve APC inaktif (hipermetile) olduğu MS-MLPA tekniği ile ortaya konmuştur (**C**). 66

- Şekil 17.** Araştırmadaki hasta bireye ait tümör dokusundan genomik DNA'nın hedef gen analiz profilleri değerlendirilmektedir. Dört adet PCR kontrol (**A**), beş adet cinsiyet kontrol (**B**), genleri aktif durumda olan erkek (46, XY) birey. Hedef 37 adet tümör supresör ve housekeeping genlerinden TP53 ve APC inaktif (hipermetile) olduğu MS-MLPA tekniği ile ortaya konmuştur (**C**). 67
- Şekil 18.** Araştırmadaki hasta bireye ait tümör dokusundan genomik DNA'nın hedef gen analiz profilleri değerlendirilmektedir. Dört adet PCR kontrol (**A**), beş adet cinsiyet kontrol (**B**), genleri aktif durumda olan erkek (46, XY) birey. Hedef 37 adet tümör supresör ve housekeeping genlerinden TP53, MSH6 ve APC inaktif (hipermetile) olduğu MS-MLPA tekniği ile ortaya konmuştur (**C**). 68
- Şekil 19.** Araştırmadaki hasta bireye ait tümör dokusundan genomik DNA'nın hedef gen analiz profilleri değerlendirilmektedir. Dört adet PCR kontrol (**A**), beş adet cinsiyet kontrol (**B**), genleri aktif durumda olan erkek (46, XY) birey. Hedef 37 adet tümör supresör ve housekeeping genlerinden MSH6 ve APC inaktif (hipermetile) olduğu MS-MLPA tekniği ile ortaya konmuştur (**C**). 69
- Şekil 20.** Araştırmadaki hasta bireye ait tümör dokusundan genomik DNA'nın hedef gen analiz profilleri değerlendirilmektedir. Dört adet PCR kontrol (**A**), beş adet cinsiyet kontrol (**B**), genleri aktif durumda olan erkek (46, XY) birey. Hedef 37 adet tümör supresör ve housekeeping genlerinden TP53 ve APC inaktif (hipermetile) olduğu MS-MLPA tekniği ile ortaya konmuştur (**C**). 70

TABLO LİSTESİ	SAYFA
	NO
Tablo 1. Kanser olgularının kadın ve erkeklerde yaş gruplarına göre dağılımı	8
Tablo 2. Doku ve hücrelerdeki meydana gelen sayısal ve yapısal değişiklere bağlı özellikler.	9
Tablo 3. Kolorektal kanser gelişme riski.	17
Tablo 4. Kolorektal kanserlerde TNM evrelemesi.	31
Tablo 5. Kolorektal kanserlerde TNM Evreleme Sistemi.	32
Tablo 6. SALS MS-MLPA ME002-C1 Tümör Supresör-2 probemix içinde mevcut olan kontrol problemleri ve incelenecek genlere ait problemlerin listesi.	55
Tablo 7. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik ve Klinik Özellikleri	62
Tablo 8. Kolorektal kanser tanılı olgulara ait her bir hedef TS APC, TP53, MGMT (191 nt) MGMT (346 nt), MSH6, BRCA1, BRCA2 genlerinde tüm hastalarda saptanan metilasyona bağlı tümör supresör inaktivasyonun oransal dağılımı.	63
Tablo 9. Kolorektal kanser tanısı alan her bir olguya ait hedef tümör supresör APC, TP53, MGMT (191 nt), MGMT (346 nt), MSH6, BRCA1, BRCA2 genlerin aktif/inaktif durumlarını göstermektedir. Araştırma sonuçlarına göre elde edilen hedef tümör supresör (TS) gen epigenetik profilleri. Tümör dokularından elde edilen yüksek moleküler ağırlıklı genomik DNA örnekleri MS-MLPA tekniği ile hedef TS genler metillenme derecelerine göre kimliklendirilmiştir.	64

ÖZET

Kolorektal karsinogenez (KRK), normal hücrenin kanser hücresine dönüşümünde genetik ve epigenetik değişikliklerin rol aldığı çok basamaklı bir süreçtir ve moleküler genetiği tüm insan kanserleri arasında en iyi anlaşılmış olanıdır. Günümüzde gelişen teknoloji sayesinde ve epigenetik faktörlerin kanserdeki rollerinin anlaşılmasıyla bu alanda yoğun çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Tümör supresör genlerin promotor bölgelerinde CpG adacıklarının anormal metillenmesi, genlerin aktivitelerini bozabilir ve susturulmasına yol açar. Bu sessizlik hücre bölünmesi boyunca kalıtılır ve metilasyon inhibitörleri ile muamele haricinde geri dönüşümsüz olduğu kabul edilir.

Çalışmamızda kolorektal kanser tanısı alan farklı tümör evresi ve farklı yaş gruplarından 20 birey yer almıştır. Öncelikli olarak tümör supresör APC geni, bunun yanında tümör supresör TP53, MGMT (191 nt), MGMT (346 nt), MSH6, BRCA1 ve BRCA2 genlerine ait promotor bölge metilasyon profilleri araştırılmıştır. Metod olarak, metil spesifik MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) yöntemi kullanılmıştır. Analizi amaçlanan gen bölgelerinin metilasyon paternleri SALSA MS-MLPA ME002-C1 tumor suppressor-2 probemix kiti kullanılarak incelenmiştir. Analizleri sonucunda APC geni %100 (20/20), TP53 geni %60 (12/20), MGMT (191 nt) geni %10 (2/20), MGMT (346 nt) geni %10 (2/20), MSH6 geni %60 (12/20) oranında metilasyon saptanmıştır. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde metilasyon saptanmamıştır.

Elde edilen epigenetik analizler, kanser vakalarında hem tümörlü dokuya özgü tedavi yöntemlerin geliştirilmesinde hem de sağkalım oranlarının artmasında oldukça yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, Epigenetik, Metilasyon, Tümör supresör APC geni, MLPA

ABSTRACT

Epigenetic Approach to Colorectal Cancer; The functional analysis of tumor suppressor gene APC

Colorectal carcinogenesis is a multistep process that occurred genetic and epigenetic changes in the transformation of normal cells into malignant cells and colorectal cancers, all of the molecular genetics of human cancer is the most well understood. Today, thanks to advanced technologies and understanding of the role of epigenetic factors in cancer, intensive studies have been started in this area. Abnormal methylation of CpG islands that tumor suppressor genes of the promoter regions, genes activity can disrupt and leads to silencing. This silence is inherited through cell division and except treatment with methylation inhibitors are considered to be irreversible.

In our study involved in nineteen individuals have diagnosis of colorectal cancer who has been different tumor stage and different age groups. Firstly, the APC tumor suppressor gene, besides the tumor suppressor TP53, MGMT (191 nt), MGMT (346 nt), MSH6, BRCA1 and BRCA2 genes belonging to the promoter region methylation analysis was performed. In the method, methyl specific MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) method was used. Analysis of the methylation pattern of gene regions was examined using SALSA MS-MLPA ME002-C1-2 tumor suppressor kit probemix. As a result of analysis APC gene 100% (20/20), TP53 gene, 60% (12/20), MGMT (191 nt) gene is 10% (2/20), MGMT (346 nt) gene 10% (2/20), MSH6 genes is 60% (12/20) methylation ratio was determined.

The obtained epigenetic analyzes, in the cancer cases both specific to tumor tissue development of treatment methods and in increasing of survival rate will be quite useful.

Key Words: Colorectal cancer, Epigenetics, Methylation, Tumor suppressor APC gene, MLPA

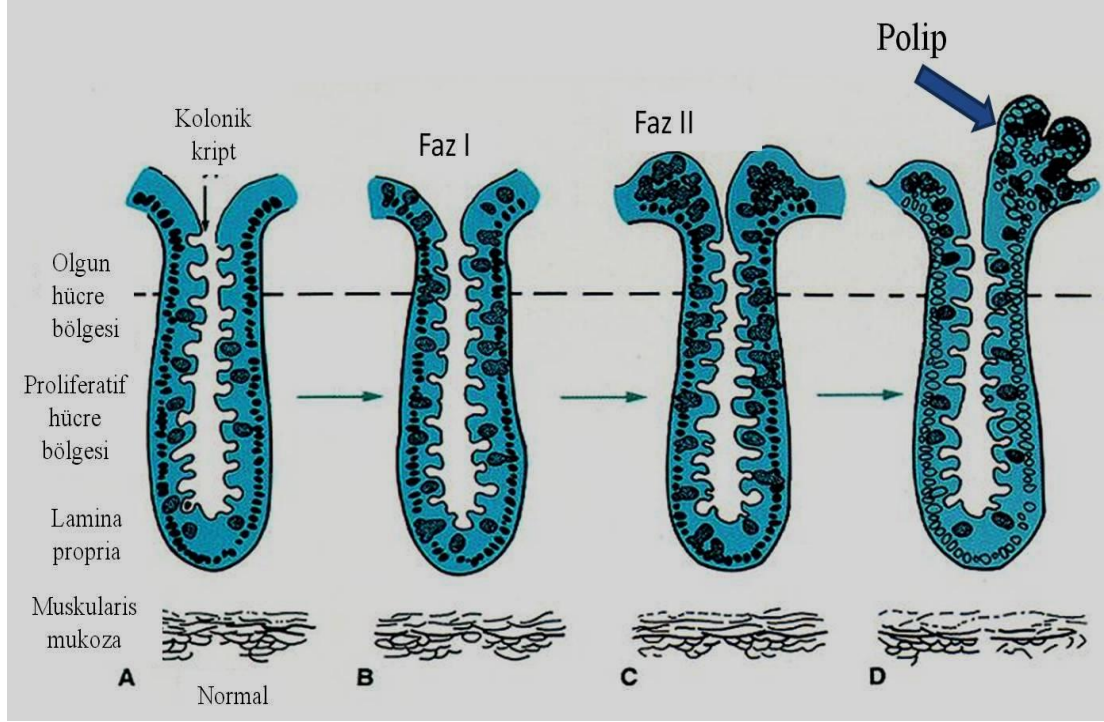
1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, gelişmekte olan dünyamızda giderek artan ve toplum sağlığını önemli ölçüde etkileyen sağlık problemlerinin başında yer almaktadır. Türkiye’de her iki cinsiyette seneler içinde artış gösteren kanserler bağırsak, rektum, lenfatik ve hematopoyetik doku kanserleridir. Dünyadaki kanser vakaları incelendiğinde kolorektal kanser (KRK) üçüncü sırada yer alırken, kanserden ölüm nedenlerinde ikinci sırada yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 2012 yılında kolorektal kanserin dünya çapında erkeklerde en yaygın görülen üçüncü (746 000 vakanın %10,0’luk kısmı), kadınlarda ise en yaygın görülen ikinci (614 000 vakanın %9,2’lik kısmı) kanser türü olduğu bildirilmiştir. Daha gelişmiş bölgelerde az gelişmiş bölgelere oranla yüksek insidansa sahip olup; meydana gelen vakaların neredeyse %55’ini oluşturmaktadır. Yaşam kalitesinin artmasına bağlı olarak kanser gelişme riski de artış göstermektedir. Bununla birlikte kanser tanısında kullanılan yöntemlerin hızla ilerlemesi ve maliyetlerinin düşmesi sebebi ile daha çok hastanın hekime başvurması ve gelişen teknoloji ile çevresel karsinojenlere maruziyetin artışı kanser sıklığını arttıran diğer etkenlerdendir.

Multifaktöryel nedenlerle gelişen kolorektal kanserlerin tanı yaşı ortalama 62’dir. Ancak kolorektal kanserler için risk 50-75 yaş arasında değişir. Yaş ilerledikçe risk oranı yükselir (Fenoglio-Presier ve ark., 1990). Kolon ve rektum çoğunlukla premalign lezyonları barındırır ve nispeten kolay erişilebilen organlardır. Bu nedenle kolorektal kanser erken teşhise uygun bir hastalıktır. Kolorektal kanseri gelişmeden önlemek ve erken evrede yakalayabilmek için tarama testleri kullanılmaktadır. Kolorektal kanser tarama yöntemleri, invaziv kanser morbiditesi ve mortalitesini azalttığı düşünülen ve bu açıdan etkinliği kanıtlanmış az sayıdaki yöntemlerdendir. Kalın bağırsağın (kolon ve rektum) polip ve kanserleri çoğu kez iyice büyüyene kadar belirti vermezler. Tarama programları ile henüz kansere dönüşmemiş (pre malign) adenomatöz polipleri ve erken dönem lokalize kanserleri saptamak ve tedavi etmek mümkündür.

Hücre bölünmesini düzenleyen genlerin (onkogenler ve tümör baskılayıcı genler) tümör virüsü tarafından işgal edilmesiyle ya da kendiliğinden oluşan mutasyonların etkisiyle kanser başlayabilmektedir. Mutasyonların oluşum hızındaki artışa bağlı olarak insan kanserlerinin gelişme süreci de hızlanmaktadır (Kılıç 2005). Kanserli

hücrelerde ortaya çıkan mutasyonlar rastgele olmayıp, kendine özgü belirli bir süreç ile ilerlemektedir. Kolorektal kanser, genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin etkileşimleri neticesinde uzun vadede ortaya çıkmaktadır. Etyolojisine bakıldığında temelde kolon mukozasındaki epitelyal hücrelerin büyüme ve farklılaşmasına neden olan genetik bozukluklar sonucunda gelişen kompleks bir süreçtir. Bu süreçte genetik mutasyonların yanında epigenetik değişimler de etkilidir. Epigenetik mutasyon olarak adlandırılabilen CpG adacıklarındaki metilasyon kalıbı değişikliği; her hücre bölünmesinde pasif olarak kalıtılan mutasyonların aksine, aktif olarak kalıtılır ve gen ifadesini de değiştirebilir. Metilasyonun gen ifadesinin düzenlenmesinde etkili olduğu bazı gözlemler vardır. Bir gendeki metilasyon sıklığı ile o genin ifade edilme (ekspresyonu) derecesi arasında ters bir ilişki bulunmaktadır. Düşük derecede metilasyon gözlenen genlerde yüksek oranda gen ifadesi (genin çalışma verimi) gözlenirken, yüksek oranda metilasyon gözlenen genlerde ise düşük oranda gen ifadesi gözlenmektedir (Jones ve ark., 2001). Sporadik KKK, fokal displastik lezyon olan adenomanın zemin bölgesinde gelişip adenom-karsinom sekansı şeklinde seyreder. Sporadik kolon kanserleri normal kolon epitelinin genetik kararsızlığı ve adenomatöz polip birlikteliği neticesinde invaziv kansere dönüşümü ile oluşmaktadır (Şekil 1).



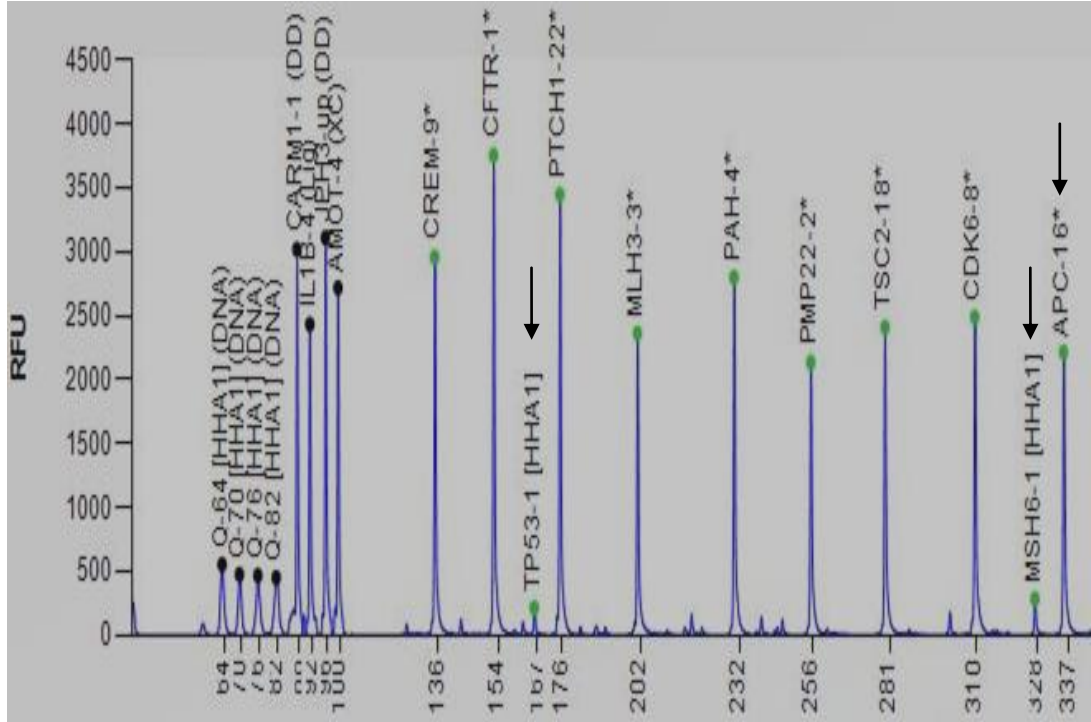
Şekil 1. Kalın barsak iç zarındaki normal kolonik hücrenin (A), anormal çoğalması ile zaman içerisinde poliplere ve kansere hüresine (D), dönüşümünü gösteren bir seri basamak.

Kolorektal karsinogenezde mikrosatellit instabilite ve kromozomal instabilite yolları Beta-katenin/Wnt ara yolağı, TGF β /SMAD ara yolağı, RAF/RAS/MAPK ara yolağı gibi pek çok yolak tümör oluşum ve progresyonunda açıklanmıştır. Bu yolaklarda birden fazla mutasyonun kademeli olarak birikimi söz konusudur.

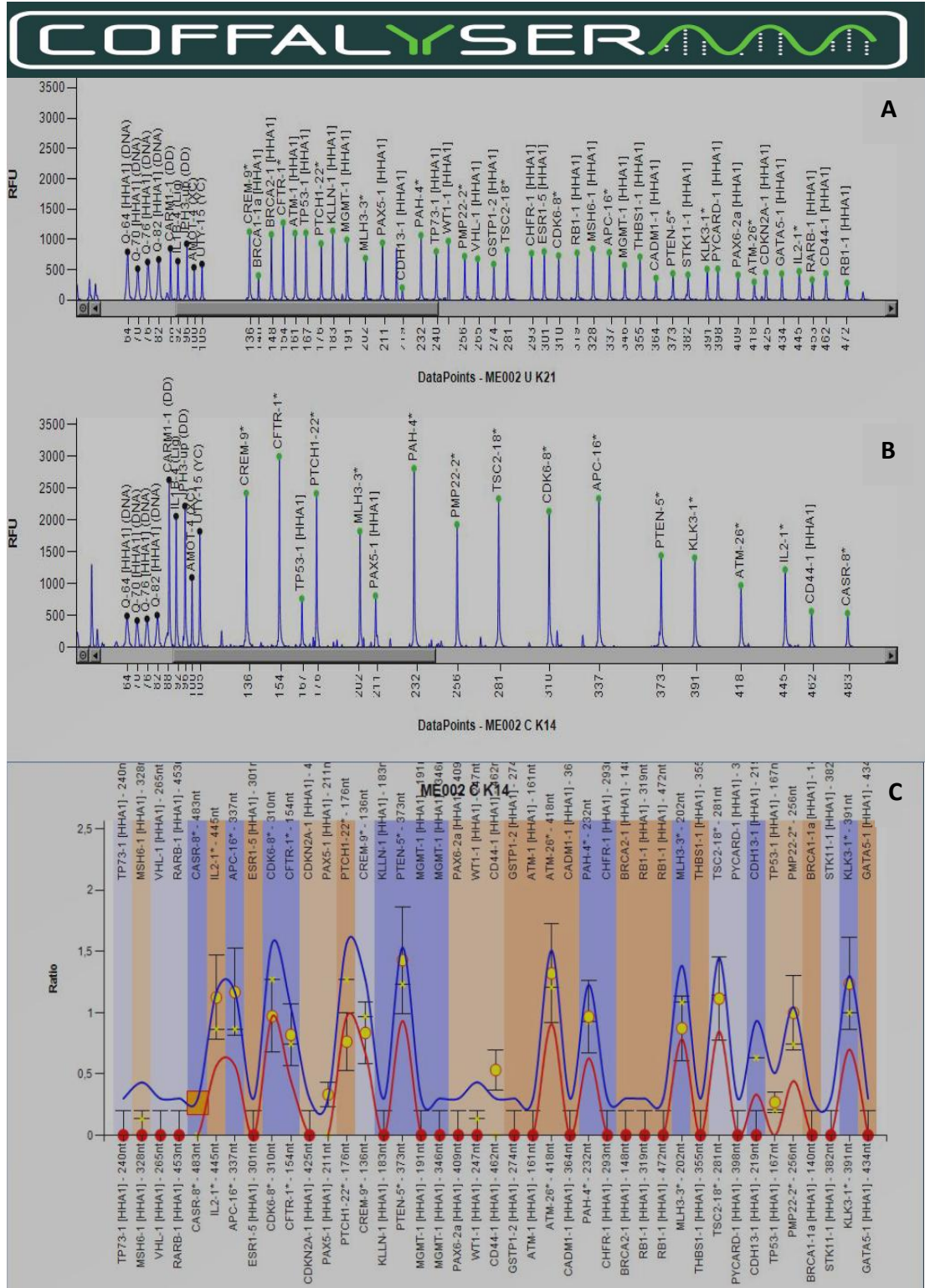
Bu tez kapsamında tümör supresör genler (TSG)'den hücreler arasında sinyal iletiminde görev alan; Beta-katenin/Wnt yolağında anahtar gen olan APC geni ve tümör supresör TP53, MGMT (191 nt), MGMT (346 nt), MSH6, ve BRCA1, BRCA2 genlerine ait CpG adacık hipermetilasyon/hipometilasyon paternleri incelenmiştir. Farklı evre ve yaş grubundan kolon kanseri teşhisi almış 20 hastaya ait tümör dokusu içeren 5 mikronluk kesitlerden elde edilmiş olan DNA örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Araştırmada yoğunlaşılacak yer promotorlardaki CpG adalarıdır. APC geninde meydana gelen mutasyon kolon kanseri gelişiminin ilk evresinde gerçekleşmekte olup devamında bir seri mutasyon geçirerek başlangıçta normal olan hücrenin kanser hüresine dönüşümüne zemin hazırlamaktadır.

Bu Yüksek lisans tezinin amacı; APC genine ait CpG adalarında meydana gelen DNA metilasyonuna bağlı tümör supresör gen inaktivasyonunun kolorektal kanserde

yerini ve önemini ortaya koymaktır. Tümörlü dokulardan izole edilen DNA'dan denatürasyon ve hibridizasyon, ligasyon ve PCR basamaklarını içeren MS-MLPA (Metil Spesifik Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) ve sekans yöntemi kullanılmış ve coffalayser programında analiz edilmiştir (Şekil 3). Bu yöntem ile tek reaksiyonda çok sayıda hedef bölge amplifiye edilebilmektedir. Ayrıca CpG dizisi içeren hedef bölgelerin metilasyon durumuna göre HhaI kesim enzimi aracılığıyla kesim işlemi gerçekleştirilmekte ve bu işlem sonucunda hedef bölgenin amplifiye olup olmamasına bağlı olarak ilgili gen bölgesinin metilasyon durumu saptanabilmektedir (Şekil 2). Metilasyon sonuçlarına göre ilgili gen aktivasyonları ile epigenetik değişimler değerlendirilmiştir.



Şekil 2. HhaI enzim kesim reaksiyonu sonucunda metillenme söz konusu olduğunda enzim kesim bölgesi kesimden korunmuştur dolayısıyla kesim gerçekleşmeyip TSG'lerden sinyal elde edilmiştir. Çalışmamızda hasta bireylerde değerlendirilen TP53, MSH6 ve APC TSG'lerin metilasyon varlığında genlerde meydana gelen sessizleşme ve inaktivasyon analizi.



Şekil 3. Sağlıklı kontrol bireye ait periferik kan dokusundan elde tümör dokusuna ait bir adet enzim kesimine maruz kalmayan normal MLPA reaksiyonu (A), Hhal enzimine maruz bırakılan Metilasyon reaksiyonu (B) ile eş zamanlı gerçekleştirilen iki reaksiyondur. Her bir TSG promoter metilasyon profillerininin 0,5-1,5 oransal değerleri arasında normalizasyonu (C).

2.GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser tek bir hastalık adı olmayıp organizmada meydana gelen ve hücreleri kontrolsüz büyüyen kötü huylu (habis=malign) tümörler için kullanılan genel terimdir. Bu tip hücreler iyi huylu (benign) tümörlerin aksine başka dokulara nüfuz etme (invazyon) ve yayılma (metastaz) özelliği gösterir. Ülkemizde 2012 yılında kanserler ölüme sebep olan hastalıklar içerisinde %21,1 ile ikinci sırada yer almaktadır. Karsinogenez çok faktörlü ve çok basamaklı bir olaydır. Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi için çok sayıda genetik değişikliklerin olması gereklidir. Bunlar arasında; nokta mutasyonları, translokasyonlar, gen amplifikasyonları, hücresel onkogen aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin (anti-onkogen) inaktivasyonu gibi mekanizmalar yer alır (Doğu 2007).

Bazı kanser türlerinde primer faktör ve sekonder olarak adlandırılan iki etken vardır. Primer faktör olarak herhangi anormal gen sorumlu tutulurken, sekonder faktörde çevresel faktörler sorumlu olup hücre çoğalması gerçekleşmektedir. Her iki faktörde de kanser türlerinin somatik hücrelerdeki mutasyon ya da mutasyonlar sonucu oluştuğu ve mutasyonların da bir seri genin ifadesini etkilediği bilinmektedir. Kanser orjinlendiği üç tür malignensi vardır; sarkom, karsinom, ve hemapoetik ve lenfoid malignensileridir. Sarkomlar kemik, kas ya da konnektif doku gibi mezenşimal dokulardan köken almaktadırlar. Karsinomlar barsak mukozası, bronşlar veya meme duktusları gibi epitelyal dokulardan gelişirler. Son olarak hemaepotik ve lenfoid malignensiler kemik iliği, lenfatik sistem ve periferik kan boyunca yayılan lösemi ve lenfomalardır. Kanser oluşumunda ise tümör supresör genler, onkogenler, ve diğer genler etkili olmaktadır. Birçok kanserde, mutasyonlar tek bir somatik hücrede oluşur ve daha sonra bölünerek kanser gelişimine yol açarlar. Daha az seyreden tipi kalıtsal (herediter) kanser sendromlarıdır. Herediter kanserleri başlatan mutasyonlar üreme (germ) hücresine aktarılarak vücudun tüm hücrelerine yayılmaktadır. Sonuç olarak her iki mekanizmada da kanser gelişimi bir kez başladığında, DNA'da oluşabilecek hasarın onarımından sorumlu ve sitogenetik yapının korunmasından sorumlu hücresel mekanizmaları kodlayan genlerdeki mutasyonlar kümülatif olarak artış göstererek kanseri yaygınlaştırdıkları bilinmektedir.

Mutasyonlar hücre bölünmesi sırasında sürekli bir şekilde gerçekleşmektedirler ve onkogenler ile tümör supresör genler diğer genlere kıyasla daha az mutasyona uğramaya meyillidirler. Kanselerdeki mutasyonları diğer mutasyonlardan farklı yapan, mutasyonların güçlü bir şekilde hücrenel artış ve uzun hücrenel yaşam için pozitif seleksiyona yol açmalarıdır.

Kanselerin oluşum sıklığı, türüne, coğrafi bölgelere, sosyo-ekonomik yaşam kalitelerine, hasta yaş ve cinsiyetine göre farklılık göstermektedir (Doğu 2007). Kanserin hücre içindeki gelişimi hemen tamamlanıp sona ermez, dolayısıyla normal bir hücre kanserli hücreye dönüşmeden önce o hücrenin genetik bilgisinde pek çok değişiklik olması gerekmektedir. Yapılan araştırmalar onkogeneze için tek bir genetik değişimin yeterli olmadığını, tümör supresör genler, proto-onkogenler ve yapısal genlerde bir dizi mutasyonun oluşması gerektiğini göstermiştir. Yani kanser gelişimi, genetik açıdan çok aşamalı bir süreçtir. Bu süreç sırasında oluşan mutasyonlar kendiliğinden ya da mutajenik etkilere bağlı olarak gelişebilir. Bu çok faktörlü ve çok aşamalı sürecin etyolojik parametre ve belirteçlerini üçe ayırarak inceleyecek olursak;

1. İmmünohistokimyasal belirteçler,
2. Moleküler genetik belirteçler,
3. Hücre büyümesini indükleyen ya da inhibe eden belirteçler olarak sınıflandırmak mümkündür (Özdemir ve Özdemir, 2014).

Hücrelerin anormal büyüme süreci aşama aşama gelişmektedir. Her bir genetik değişiklik, hücreyi anormal büyüme sürecinde biraz daha ileriye taşımaktadır. Tüm hücrelerin genetik özellikleri birebir aynı olmadığı için, genetik değişikliklerin ne zaman gerçekleşeceğini tahmin etmek neredeyse imkansızdır. Bu nedenle bazı kanser tipleri oldukça yavaş bir seyir gösterirken, bazıları ise hızla ilerleyip bir kaç ayda bireyin sağlığını bozmaktadır. Birçok kanser türünde, tümör dokusunda belirlenen özgün onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki hipermetilasyon, mikrosatellit instabilitesi, kromozomal translokasyonlar, nokta mutasyonları ve heterozigotluk kaybı (LOH) gibi moleküler düzeydeki değişiklikler hastaların önemli bir bölümünde serum veya plazmada da olduğu bildirilmiştir (Yamada ve ark., 1998).

Tablo 1. Kanser olgularının kadın ve erkeklerde yaş gruplarına göre dağılımı (Doğu 2007).

Yaş grubu	Cinsiyet					
	Erkek		Kadın		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
<20 yaş	6	0,6	10	0,9	16	0,8
21-39 yaş	75	7,1	144	14,0	219	10,5
40-59 yaş	493	46,7	504	49,0	997	47,8
60-74 yaş	424	40,2	323	31,3	747	35,8
>75 yaş	57	5,4	49	4,8	106	5,1
Toplam	1055	100,0	1030	100,0	2085	100,0

2.1.1. TÜMÖR GELİŞİMİ

Tümör bir diğer adıyla neoplazi, yeni büyüyen ve yeni oluşan anormal doku kitlesidir. Büyümesi normal doku büyümesine kıyasla fazladır ve aralarında bir bağlantı yoktur, olayın başlamasına neden olan ve kendisine uyarı kalktıktan sonra bile büyümeye devam eden anormal doku kitlesidir. Büyüme amaçsızdır ve otonomi gözlenir. Tümör gelişiminden sorumlu faktörler; proto-onkogenler (onkogenler), tümör supresör genler, replikasyon hatalarını belirleyip onaran genler (mismatch repair genler), telomeraz genlerin aktivite kusurları ve son olarak direkt genetik materyalde bir bozukluğa bağlı olmasa da hatalı gen ekspresyonuna neden olan epigenetik değişikliklerdir.

Tablo 2. Doku ve hücrelerde gerçekleşen sayısal ve yapısal değişikliklere bağlı özellikler

NEOPLAZİ ÇEŞİTLERİ	ÖZELLİKLERİ
Hiperplazi	Hücrelerin sayısal artışıdır, uyaran ortadan kalkınca regresyon olur, bazen premalign durumlara yol açar, en az tümör oluşturma riski taşır.
Metaplazi	Diferansiye olmuş erişkin dokusunun diğer bir diferansiye dokuya dönüşmesi durumudur. Epitelyal metaplazi geri dönüşümlü, bağ doku metaplazisi geri dönüşsüzdür.
Displazi	Anormal doku gelişmesidir. Hücre çekirdeği malignite kriterlerine yakın özellik gösterir. Hücreler belirgin pleomorfizm gösterir. Genelde malignite öncüsüdür. Displastik hücrelerin her zaman kanserleşmesi beklenmez. Tüm epiteli içermeyen değişiklikler geri dönüşümlüdür.
Anaplazi	Malign değişimin göstergesidir, farklılaşmanın kaybı olarak nitelenir, kanser hücresinin karakteristik özelliğidir, hücreler normal yapısal ve fonksiyonel özelliğini kaybeder, andiferansiye hücre olarak da ifade edilir.

2.1.1.1. Onkogenler (proto-onkogenler)

Onkogenler genomda aktif olarak bulunan protoonkogenlerin mutant formlarıdır. Bugüne kadar 80'den fazla protoonkogenin her birinin onkogenik potansiyel göstererek çeşitli kanser oluşumlarında rol aldığı saptanmıştır. Onkogenlerin kanser gelişimindeki rolü 60'lı yıllardan itibaren ortaya konmuştur ve kanserin moleküler temelleri hakkında ilk bulgular tümör virusları ile yapılan araştırmalarla sağlanmıştır. Bu araştırma sonucunda onkogen olarak adlandırılan belirli genlerin hücreleri transforme etme yetenekleri olduğunu gösterilmiştir. Ancak böyle olsa bile insan

kanserlerinin büyük çoğunluğu (yaklaşık %80'i) virusların etkisiyle değil radyasyon ya da kimyasal karsinogenez gibi başka nedenlerle ortaya çıkmaktadır.

2.1.1.2. Tümör Supresör Genler

Tıpkı onkogenler gibi tümör supresör genler de hücre çoğalmasının düzenlenmesine katılan moleküller şifrelerdir. Fakat onkogenler ile tümör süpresör genlerin farkı; onkogenler protoonkogenler aracılığıyla aktif olduklarında kansere neden olurken, tümör süpresör genler ise çalışmadıklarında yani inaktif olduklarında kansere neden olur (<http://www.spektromar.com.tr>, Erişim tarihi: 1 Mayıs 2014). Tümör supresör genlerin esas fonksiyonu tümör oluşumunu engellemek değil, hücre büyümesini kontrol etmektir. Knudson adlı araştırmacı çift mutasyon teorisi de bu ifadeyi desteklemektedir. Bu teoriye göre herediter olan olgularda bir genetik değişiklik ebeveynlerden birinden gelir ve tüm somatik hücrelerde vardır, İkinci mutasyon ise retinal hücrelerin herhangi birinde olur ki bu ilk mutasyonu da taşımaktadır. Sporadik vakalarda ise her iki mutasyon aynı tek hücrede somatik olarak vardır. Buna en iyi örnek retinoblastom (Rb) geninde açıklanmıştır. Mutant kalıtsal Rb geni taşıyan çocuk normaldir (Rb lokusu için heterezigot olduğundan), sadece kanser gelişme riski yüksektir. Mutant allel homozigot olduğu zaman kanser gelişmektedir. Kısacası TSG'ler, hücre döngüsünü kontrol ederler ve onarılamayan herhangi bir DNA hasarı olduğunda hücreyi apoptozise sevk eder. Prototipik örnekler p53, APC, DDC (deleted in colorectal cancer), ve DPC4 (deleted in pancreatic cancer 4) genleridir. Tümör gelişimi için her iki allelde de mutasyon gereklidir aksi halde sağlam tek allel varlığı gösterilmesi gereken etkiyi yaratmaya yetecektir.

2.1.1.2.1. Hücre Yüzeyinde Etkili olan Tümör Supresör Genler

Hücrenin büyüme ve davranışını düzenleyen hücre yüzeyinden salınan çeşitli moleküller vardır. En önemlileri Transforme edici büyüme faktör-beta (Transforming Growth Faktör=TGF- β), Kadherin ve Silinmiş kolon kanseri (Deleted Colon Cancer=DCC) geni sayılabilir. TGF-beta büyümeyi engelleyici faktördür. Kadherin hücreler arası adezyonu sağlar. DCC geni ise hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkisini sağlar çevreden aldığı uyarı ile hücrenin büyüme ve diferansiasyonunu düzenlemekle görevlidir. TGF-beta büyümeyi engelleyen genlerin transkripsiyonunu regüle eder. Buradaki mutasyon pek çok tümörde görülmektedir.

2.1.1.2.2. Uyarı İletim Sistemini Düzenleyen Tümör Supresör Genler

Tümör süpresör genlerin etkili olduğu bir diğer alan büyüme sinyalini azaltmaktır. Nörofibromin 1 (NF1) geni ile Adenomatöz polipozis koli geni (APC) bu kategoridedir. NF1'de ve APC'de germline mutasyon benign tümörlerle ve karsinom öncüleriyle ilişkili bulunmuştur. APC geni vakaları ile doğan bir kişide 1 mutant allel vardır ve yaşam sırasında da pek çok polip gelişmektedir. Ancak tümör gelişimi için bu yeterli değildir 2. kopyanın mutant olması gerekmektedir. Adenomdan kanser gelişimi ek mutasyonlarla mümkündür. APC geni sitoplazmada lokalize ve diğer proteinlerle ilişkilidir ki bunlardan biri beta katenindir. Beta katenin çekirdeğe ulaşarak transkripsiyon faktörlerini etkileyebilmektedir. APC'nin görevi katenini yıkmak ve sitoplazmada az bulunmasını sağlamaktır. APC gen inaktivasyonu veya kaybı katenin seviyesini artırır ve hücrel artış meydana gelir. Bazen Katenin mutasyonu da olabilmektedir. Mutant katenin APC'nin yıkıcı etkisine direnç göstererek yine hücrel artışa neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı bazı kanser vakalarında APC geni aktif olsa bile tümör gelişimi görülmektedir. NF1 geni de APC gibi davranıyor. Bir mutant alleli olanda sayısız nörofibrom gelişmektedir, 2. kopyasında mutasyon olunca veya ek mutasyonlarla malign tümör olabilmektedir.

2.1.1.2.3. Çekirdekte Etkili olan Tümör Supresör Genler

Çekirdeğe lokalize olan tümör süpresör genler retinoblastom (Rb), p53 ve Wilms tümör (WT1)'dür.

Retinoblastom(Rb) Geni;

İlk tanınan tümör süpresör genidir. Hücre döngüsünde anahtar role sahiptir. Her hücre tipinde ifade edilir. Aktif ve inaktif formu vardır. Aktif formunda hücre siklusunda G1 fazından S fazına geçerken fren görevi vardır. Hücreler GF ile fosforile olunca Rb inaktifleşir ve fren ortadan kalkar. S fazına giren hücreler bölünmeye başlar. Retinoblastom geninin bu etkilerinde önemli rol oynayan bir faktörde E2F proteindir. E2F ile sıkı bağlantıda iken fosforile olunca E2F'yi serbest bırakır ve serbest kalan E2F transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile hücrenin S fazına girmesini sağlar. Retinoblastom gen proteini olmazsa veya E2F'nin regülasyonu bozulursa hücre döngüsünün moleküler freni bozulur ve hücreler sürekli S fazına girer. Bununla birlikte Rb görev yaptığı sürece indirekt olarak onun fonksiyonunu düzenleyen ürünler örneğin; siklinler ve SBK'lar da ve hatta SBK

inhibitörlerinde mutasyon Rb kaybının yarattığı etkileri taklit ederek hücreye zarar verir. Sonuç olarak hücre döngüsü kontrolünün kaybı malign transformasyonun merkezidir ve siklusun 4 anahtarından en azından birinin mutasyonu gerekir. Bunlar Rb, siklinler, SBK'lar ve SBK inhibitörlerinden p16'dır.

P53 Geni;

İnsan tümöründe tek ve en sık genetik değişikliğin gerçekleştiği gen adaydır. Neredeyse %50'den fazla tümörde p53 geninde mutasyon varlığı söz konusudur. Özellikle geninin homozigot mutasyonu nerdeyse her tip kanserde görülmektedir. Daha nadir olarak bazıları p53'ü kalıtsal şekilde mutant allel olarak bulundurmaktadır. Retinoblastom geni gibi 1 mutant allelin kalıtımı kişinin malign tümör geliştirmesi için predispozandır çünkü sadece ek bir arıza normal olan ikinci alleli bozar. P53 geni çekirdekte lokalizedir ve diğer genlerin transkripsiyonunu kontrol etmek primer görevidir. Bu anlamda çok önemli bir rol üstlenmektedir. Rb aksine hücre siklusunun bekçiliğini yapmaz. P53'ün acil fren için çağırılması ancak DNA hasarı, radyasyon, mutajenik kimyasallarla temas olduğunda söz konusudur. Genetik materyal zarar gördüğünde durağan p53 harekete geçer. İki ana hedefi vardır bunlar; hücre siklusunu durdurmak ve Apoptozisi uyarmaktır. P53 ile indüklenen siklus durması G1 fazının geç döneminde olur ve p53 bağımlı SBK inhibitörleri aracılığı ile olur. SBK inhibitörlerinden bu işte görevli olanı p21'dir. Siklin/SBK kompleksini inhibe eden p21 geni, S fazına girmek için gerekli olan Rb fosforilasyonunu engeller. Hücre siklusunda durma ilk etapta hoş karşılanır ve DNA hasarı tamiri için zaman tanınır. DNA hasarı başarı ile tamir edilirse p53, protein bağlayan mdm2'ye bağlanıp etkisi sonlanır. Eğer DNA hasarı tamir edilemezse apoptozisi uyaran genler görevlendirilir. P53 genin homozigot mutasyonu DNA'nın tamir edilememesine neden olur ve mutasyon hücrelerde birikir sonuçta malign transformasyon oluşur.

BRCA1 ve BRCA2 Geni;

Bu genleri kalıtsal olarak mutant biçimde taşıyan kişilerde meme kanseri gelişme riski yüksektir. BRCA-1 ve BRCA-2 geninin fonksiyonu tam olarak anlayamamıştır. Bununla birlikte protein ürünleri çekirdekte lokalizedir ve transkripsiyon faktörleri ile ilişkilidir. Bazı verilerde bu genlerin DNA tamiri ile ilişkili olduğu söylenmektedir. BRCA geninde olası bir mutasyon hücre büyümesini

doğrudan etkilemez, DNA replikasyonunda hatalara neden olarak ve hücre siklusunu etkileyerek genlerin mutasyonuna yol açmaktadırlar. Hücre siklusunu p21 aracılığı ile regüle ederler.

2.1.1.3. Heterozigosite Kaybı (LOH)

Tümör supresör genlerden birinin sahip olduğu allelerden birisinde mutasyon varlığı sonucu genin işlevini yitirmesi fenotipe yansımayacaktır. Bu durumda diğer allel rutin görevi olan tümör baskılayıcı işlevini yerine getirmeye devam edecektir. Bu şekilde her iki allelin birbirinden farklı olması durumu "heterozigot" olarak adlandırılır. Daha sonraki aşamada sağlam allelin de kaybı ya da mutasyonu gelişmesi halinde heterozigot olma durumu kaybedilir. Bu olay heterozigosite kaybı (Loss of Heterozygosity= LOH) olarak adlandırılmaktadır. Heterozigosite kaybı, tümör supresör geninin fonksiyonundaki kayıp tümör gelişiminin başlamasına veya ilerlemesine neden olmaktadır.

2.1.1.4. Hatalı Eşleşme Onarım Genleri (MMR)

Genetik bilgiyi taşıyarak nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA üzerinde, sürekli olarak hasar oluşmaktadır. Her bir insan hücresinin DNA'sında günde yaklaşık olarak 104 adet kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olan hasar meydana gelmektedir (Dinçer ve Akçay, 2000). Replikasyon sırasında ortaya çıkabilecek hatalar ya da mutasyonlar hatalı eşleşme onarım (Mismatch Repair=MMR) genleri tarafından fark edilerek onarılmaya çalışır. Ancak bu genlerin kendilerinde mutasyon meydana gelmesi halinde daha sonra oluşacak mutasyonların onarımını engelleyerek tümör gelişimine yol açacaktır.

Hatalı Eşleşme Onarımında tümör gelişimi için her iki allelin de inaktif olması gerekir. Bugüne kadar en çok araştırılmış MMR genleri, MLH1, MSH2, PMS1, ve PMS2'dir. MMR genleri mutasyonlu olan tümörlerde her hücre bölünmesinde çok sayıda replikasyon hatası mevcuttur ve onarılamazlar. Genlerin bazı bölgelerinde kodlanmayan özel DNA dizileri vardır. Bunlara mikrosatellit olarak adlandırılır. Mikrosatellit yapıları canlı türlerinde ve bireyden bireye farklılık gösterebilir dahi bir bireyin tüm hücrelerinde aynıdır. MMR gen kusurlarından ilk etkilenen bölgeler buralardır ve mikrosatellit instabilitesine neden olmaktadır.

2.1.1.5. Telomeraz Aktivitesi

Kromozom uçlarında stabilizasyonu sağlayan özel DNA dizileri mevcuttur. Bu diziler özelleşmiş TTAGGG şeklinde yapılar olup telomer olarak adlandırılmaktadır. Görevleri kromozomların stabilizasyonunu sağlamak, uç uca füzyonu engellemek ve degredasyondan korumaktır. Hücre çoğaldıkça ve yaşlandıkça telomer boyunun kısaldığı görülür. Telomeraz enzimi, telomeraz geninin aktivasyonu ile sentezlenir ve telomerin sabit kalmasını sağlar.

2.1.1.6. Epigenetik Değişimler

Tümör oluşumuna neden faktörlerde birisi de epigenetik değişimlerdir. Dokulardaki bu tür epigenetik değişiklikler genlerin sessizliğine neden olarak kanser oluşumunda rol oynamaktadır. Epigenetik değişimler geri dönüşümlü oluşları ve DNA'nın baz dizisinde bir değişime neden olmamaları gibi özellikleriyle genetik değişimlerden ayrılırlar. Prototipik epigenetik değişimler, DNA metilasyonlarıdır. DNA hipometillenmesi veya hipermetillenmesi normalde aktif olan bir genin inaktivasyonu ile sonuçlanabilir.

- Onkogen ve Tümör Supresör Genlerin Tümör Gelişimdeki Roller

Kanser gelişimi normal hücrelerin giderek daha malin nitelik kazandığı, çok aşamalı bir süreçtir. Tümör başlangıcı ve gelişiminde, gerek onkogenlerin aktivasyonu, gerekse tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu kritik birer aşamadır. Çok sayıda gende biriken hasar sonunda oluşan kanser hücresi, anormal çoğalma ve yayılma ile metastaz potansiyelinde artış gibi karakteristik özellikleri kazanır. Çok sayıda hatanın rolünü en iyi, Bert Vogelstein ve arkadaşları tarafından ayrıntılı biçimde araştırılan, kolon karsinomu modelinde anlaşılmıştır (Vogelstein ve ark., 1988). Bu tümörlerde dört farklı aktiviteye sahip onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde sıklıkla mutasyon görülür. Bunlar;

1-ERK sinyal yolunu etkileyen ras ve raf onkogenleri

2-Wnt sinyal yolunun bileşenleri olan tümör baskılayıcı veya onkogenler

3-TGF- β sinyal yolunda görev yapan tümör baskılayıcı proteinler

4-p53

Kolon kanseri gelişiminde belirli aşamaları temsil eden lezyonlar ameliyat ile düzenli olarak çıkartılabildiğinden, bu değişiklikler tümör gelişiminin belirgin aşamaları ile ilişkilendirilmiştir. Bu aşamalarda, Wnt sinyal yolunun bir bileşeni olan

APC gen inaktivasyonunun tümör gelişiminde erken bir olay olduğu gösterilmiştir. Ailesel adenomatöz polipozlu hastalarda, mutant APC geninin genetik aktarımı, barsak hücrelerinin anormal çoğalmasına ve hastalarda çok sayıda çok sayıda adenom gelişmesine neden olur. APC mutasyonları, kalıtsal olmayan barsak kansinomlarında da sık görülür ve genellikle hastalığın erken aşamasında saptanır. Bazı durumlarda ise Wnt sinyal yolunun aktifleşmesi, APC geninde değil, Wnt sinyal yolunda APC'den daha aşağıda yer alan β -kateinini kodlayan gendeki mutasyonların sonucu gelişir. Daha sonra K-ras geninde mutasyonlar ortaya çıkar, K-ras mutasyonları barsak adenomlarında sık görülür. Bazı barsak tümörlerinde K-ras yerine raf onkogen ailesinin üyesini (B-raf) aktifleştiren mutasyonlar bulunur. Raf, Ras'ın hemen altında yer aldığından, K-ras ya da B-raf genlerinden birinin mutasyon sonucu aktifleşmesi hücrede ERK sinyal yolunun uyarılmasına yol açar. Hemen tüm barsak kanserlerinde TGF- β sinyal yolunu etkileyen mutasyonlar bulunur. TGF- β sinyal yolu Cdk (siklin bağımlı kinaz) inhibitörlerinden Ink4 ailesinin bir üyesi olan p15'in sentezini artırarak hücre çoğalmasını hızlandırır. TGF- β sinyal yolunu etkileyen mutasyonlar da kolon kanseri gelişiminde, göreceli olarak, erken dönemlerde gerçekleşir ve sıklıkla adenomlarda görülür. Bazı tümörlerde TGF- β reseptörünü kodlayan TBR11 tümör baskılayıcı genini inaktive eder. Başka durumlarda ise mutasyon sonucunda TGF- β sinyallerinin hedefi olan smad2 ve smad4 transkripsiyon faktörlerini kodlayan tümör baskılayıcı genler inaktifleşir. Son olarak da tümör gelişiminin daha geç bir aşamasında p53 tümör baskılayıcı geni inaktive olur. Bu yüzden, çok basamaklı barsak kanserinin gelişiminde hücre çoğalmasını ve sağ kalımını düzenleyen farklı sinyal ileti yollarını etkileyen, çok sayıda onkogen ve tümör baskılayıcı gende biriken hasar sorumludur. Onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde biriken hasarın, meme ve akciğer kansinomları gibi başka kanserlerin de gelişiminde benzer şekilde rol oynadığı düşünülmektedir. Kanser hücrelerinin tipik özelliği olan hücre çoğalmasının giderek kontrolden çıkmasının, normal koşullarda hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen çok sayıda genin ürünlerinden ortaya çıkan anormalliklerin toplu sonucu olduğu kabul edilmektedir.

2.2. KOLOREKTAL KANSER

Kolon kanseri gelişiminde doğuştan gelen ailesel yatkınlık ve daha sonra kazanılan genetik bozukluklar rol oynamaktadır. Kolorektal kanser genetiği alanındaki çalışmalar günümüzde hız kazanmıştır bu sayede moleküler genetiği tüm insan kanserleri arasında en iyi anlaşılmış olanıdır. Kolorektal kanserler, yılda bir milyon yeni vaka ile kanser olgularının %9,4'ünü oluşturmaktadır. Bir dizi moleküler olay sonrası ortaya çıkan ve normal mukozadan tek bir kript epitelindeki değişikliklere, küçük iyi huylu (benign) tümörlerden (adenomatöz polipler) adenokarsinomlara kadar uzanan bir seri morfolojik değişimle gerçekleşen olgudur. Başlıca tanımlanmış adenomdan kansere geçiş serisi adenomatous polyposis coli (APC) gen aktivasyonu, K-ras onkogen aktivasyonu, p53 mutasyonu, kromozom instabilitesi, mikrosatellit instabilitesi gibi birçok genetik değişiklik sonucu olmaktadır (Vogelstein ve ark., 1988). Son 20 yıldır kolorektal kanserlerde kromozomal anomaliler saptandığı bildirilmiştir ve son veriler özellikle 5q, 17p ve 18q kromozom lokalizasyonlarındaki allelik kayıplarının major rolü oynadığını göstermektedir. Kolorektal kanser oluşum biçimleri incelendiğinde; tüm vakalar göz önüne alındığında %75-80 kadarı sporadik olarak gelişmekte olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte %15-20'sini ailesel kolorektal kanserler oluşturmaktadır. Ailesel kolorektal kanser genetik geçiş şekli tam olarak bilinmezken, yaklaşık %5'ini oluşturan kalıtsal kolorektal kanserin genetik geçiş yolları ve bozuklukları bilinmektedir. Kalıtsal kolorektal kanserlerin %3-4 kadarı "kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser" (HNPCC) aynı zamanda "Lynch sendromu" olarak bilinir. Bunların %1'den daha az kısmını ailesel adenomatöz polipozis sendromları (FAP) oluşturmaktadır. Kolorektal kanser, Amerikada her iki cinsiyette teşhis edilen ve kanser ölümlerine yol açan en yaygın 3. Kanser türü olduğu bildirilmiştir (American Cancer Society 2013). Türkiyede 2009 kanser istatistiklerine göre hem erkek, hem de kadınlar için en sık görülen ilk beş kanserin içinde olup; kadınlarda en yaygın 3. kanser türü ve erkeklerde en yaygın görülen 4. kanser türüdür (<http://www.kanser.gov.tr>, Erişim tarihi: 6 Mayıs 2014). Yapılan araştırmalarda KKK gelişme riski dünyanın gelişmiş bölgelerinde daha yüksek olup yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır.

2.2.1. Kolorektal Kanser Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi

Kolorektal karsinom etiyolojisinde genetik faktörlerin önemi olduğu kadar çevresel faktörlerin de etkisi vardır. Her yaşta görülebilmemesine rağmen ilerleyen yaş sporadik kolorektal kanser için risk oluşturmaktadır. Genellikle 50 yaş üzerinde genetik anomaliliklerin sıklığının artması ve çevresel faktörlerin daha uzun süreli etkili olması bu riski daha da arttırmaktadır ve ortalama görülme yaşı 60-65'tir. (<http://www.kanser.gov.tr>, Erişim tarihi: 6 Mayıs 2014). Bununla birlikte ailesel ya da kalıtsal olanlarda ortaya çıkış daha erken olup genellikle 30'lu yaşlardır.

Yüksek oranda tetikleyici risk faktörleri; ileri yaş, doğum yeri, Familial polipozis/Gardner sendromu, herediter nonpolipozis kolorektal kanser, uzun süreli ülseratif kolitten, orta derecede risk faktörleri ise yüksek oranda kırmızı et içeren beslenme tarzı, daha önce adenom öyküsü olması, pelvik ışın tedavisi uygulanmış olmasıdır. Daha az etkili olan risk faktörleri ise yüksek oranda yağ içeren besin tüketimi, alkol ve sigara içilmesi, obezite, uzun boy, kolesistektomi ameliyatı, fazla miktarda 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 (Corman 2002).

Tablo 3. Kolorektal kanser gelişme riski

Aile Öyküsü	Hayat Boyunca Kolon Kanseri gelişme riski
Ortalama risk (> 50 yaş, ailede kolon kanseri öyküsü yok)	%5-6
Bir 1. derece yakınında kolon kanseri varsa	2-3 kat
İki 2. derece yakınında kolon kanseri varsa (ya da < 50 yaş bir 1. Derece yakınında CA varsa)	3-4 kat
Bir 2. ya da 3. Derece yakınında CA varsa	1,5 kat
FAP	%100
HNPCC	%80

2.2.2. Genetik Faktörler

Son yıllarda gerçekleştirilen moleküler genetik ve gen analizi çalışmaları sayesinde kolon kanserine neden olan genetik değişiklikleri açıklanmaya başlamıştır

(Engin 2005). Çevresel ve kalıtsal multifaktöriyel nedenlerle başlayan kolorektal kanser sonuçta somatik ve herediter mutasyonlarla meydana gelebilen “genetik bir hastalık” olarak tanımlanmaktadır. Hücrel artış genetik kontrol altındadır ve çevresel mutajenler, somatik mutasyonlar ve ailesel yatkınlık kanser gelişimiyle bağlantılıdır (Kingston 2002). Günümüze kadar kanser oluşumunun genetik mekanizmasını açıklamaya yönelik olarak gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalar tüm kanserlerin oluşumunda üç gen sınıfının etkili olduğunu, bu genlerde meydana gelen mutasyonların kanserleşmenin esasını oluşturduğunu göstermektedir. Bu genler sırasıyla protoonkogenlerin mutasyona uğraması sonucu oluşan onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir (Engin 2005).

a) Herediter Nonpolipozis Kolon Sendromları (HNPCC)

Otozomal dominant geçiş gösteren, erken yaşta ortaya çıkan bir hastalıktır. Lynch I ve Lynch II sendromu olarak da bilinmektedir. Prevalansı 1000’de 2-5 kadardır. Bunların %3-8’i kolorektal kanserleri oluşturmaktadır.

Lynch I sendromu: Daha erken başlangıç söz konusudur. Sıklıkla sağ tarafa lokalize ya da birden fazla lokalizasyonda kolon kanserlerinin görüldüğü alt tiptir.

Lynch II sendromu: Lynch I sendromuna ek olarak mide, kolorektal, jinekolojik, üriner sistem ve meme kanserleri ile birliktelik ve risk artışı vardır.

HNPCC’de sporadik kanserlerden farklı olarak kanser daha erken yaşta ortaya çıkmaktadır ve özellikle sağ kolona yerleşmektedir. Müsinöz ve kötü diferansiye tip kanser daha sıklıkla izlenmektedir. Bir veya birden fazla odakta aynı anda görülen senkron tümörlerin ve farklı zamanlarda birbirinden bağımsız primer odak olarak saptanan metakron tümörlerin gelişme riski de yüksektir.

Tanı için Amsterdam Kriterlerinden’den yararlanılmaktadır;

1- Üç veya daha fazla akrabada histolojik olarak doğrulanmış KRK varlığı ve bu akrabaların biri diğer ikisinin birinci derece akrabası olmalıdır.

2- En az 2 nesli etkileyen ailesel KRK varlığı olmalıdır.

3- 50 yaşından önce tanı konan 2 veya daha fazla ailesel KRK olgusu olmalıdır (Robert ve Jonathan, 2010).

b) Familyal Adenomatöz Polipozisler (Ailesel Adenomatöz Polipozisler)

Familyal polipozis koli (FAP): Kromozom 5 (5q21) üzerinde lokalize adenomatöz polipozis (APC) genindeki germline mutasyonlar sonucu oluşan FAP otozomal

dominant kalıtılmaktadır. Tüm kolonda çok sayıda adenomatöz polip gelişimiyle karakterize bir sendromdur. Bir olguya FAP diyebilmek için en az 100 polip olmalıdır. Genellikle hayatın ikinci on yılında görülür ve ortalama 16 yaşında semptomlar ortaya çıkmaktadır. Birçok KRK'in hayatın üçüncü on yılında başlaması nedeniyle ile proflaktik kolektomi en geç 20-25 yaşlarında yapılmalıdır. Proflaktik kolektomi yapılmaz ise, hastaların %90'nından fazlasında kolonda bir ya da daha çok odakta, 40 yaş üzerinde KRK gelişimi izlenmektedir. FAP tüm KRK'in %0,5'inden sorumludur ve prevalansı yaklaşık 10.000'de 1'dir.

Gardner Sendromu: Yüksek KRK gelişme riskinin bulunduğu polipozis koli sendromlarının bir alt grubudur ve otozomal dominant geçiş göstermektedir. Bu sendromda görülen adenomlar yalnız kolonda değil mide, duodenum ve ince barsakta da oluşabilir. Eşlik eden lezyonları, yumuşak doku tümörleri, osteom (mandibula ve kraniumda), fibrom epidermoid kist, desmoid tümör, diş anomalileri, glioblastoma, tiroid papiller karsinom, hepatoblastoma, safra yolları kanserleri ve pankreas karsinomu bunlardan bazılarıdır (Steven ve Jonathan, 2010).

Turcot Sendromu: Otozomal dominant geçiş gösteren bir sendromdur. Santral sinir sistemi malign tümörleri (glioblastom) ile birlikte kolon polipleri gözlemlenmektedir. Puberteden önce kolonda polip nadiren görülür, ortalama 25 yaş civarında sıklıkla gözlemlenmektedir (Steven ve Jonathan, 2010).

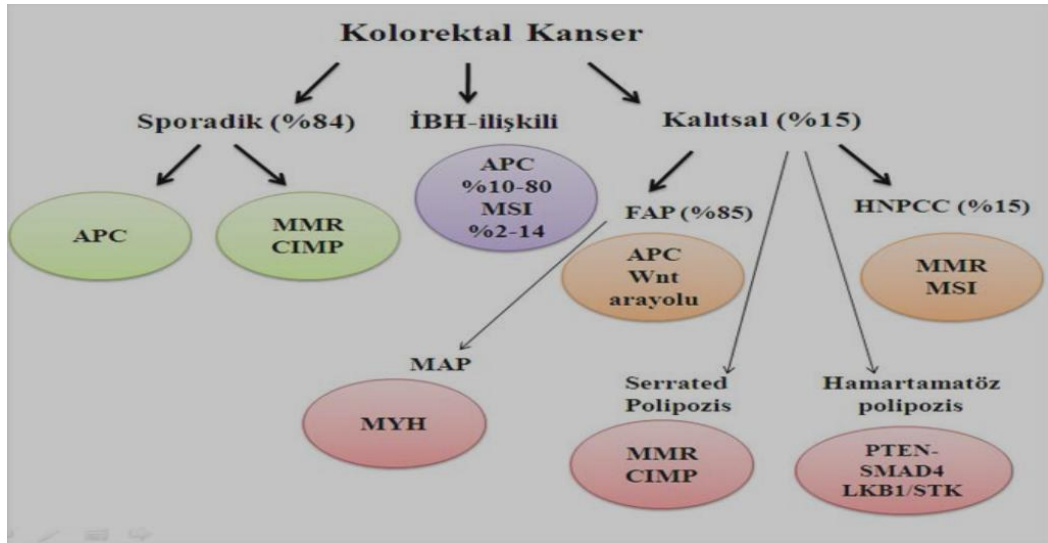
Peutz-Jeghers Sendromu: Ağır derecede atipi gösteren adenomatöz poliplerin bir kısmından KRK gelişme riski bulup, otozomal dominant geçiş gösteren ve LKB1 gen mutasyonunun gözlemlendiği polipozis sendromudur. Bu sendrom ile birlikte pankreas, meme, akciğer, over, ve uterus gibi KRK dışı kanser gelişme riski artmaktadır (Steven ve Jonathan, 2010).

Muir-Torre Sendromu: Prognozu sporadik kolon kanserinden daha iyidir, erken yaşta KRK gelişimi gösterir ve otozomal dominant geçiş gösteren sendromdur (Steven ve Jonathan, 2010).

Cowded Sendromu: Kromozom 10'a lokalize PTEN geninde mutasyonun gözlemlendiği otozomal dominant geçiş gösteren bir hastalıktır (Robert 2010). Fasyal trisilemma, akral keratoz ve oral mukozal papillom gibi mukokutanöz lezyonlar, kolorektal polipler ve değişik bölgelerde artmış malignite riski ile karakterize bir sendromdur (Steven ve Jonathan, 2010).

Cronkhite-Canada Sendromu: Mide, ince barsak ve kolon boyunca tüm gastrointestinal sistemde yaygın juvenil tipte poliplerin görüldüğü polipozis sendromudur. Bu polipler adenomatöz değişimler ve KRK gelişme potansiyeline sahiptir. Sendromun ek bulgularında; gastrointestinal sistemde kanama, kilo kaybı, ciltte hiperpigmentasyon, saç dökülmesi, tırnaklarda distrofi ve diyare görülmektedir (Steven ve Jonathan, 2010).

MUTH Homolog (MYH) İlişkili Polipozis: MYH ilişkili polipozis otozomal resesif kalıtımla çok sayıda kolorektal adenom ve kanserlerden oluşan bir sendromdur. MYH oksidatif DNA hasarını düzelten baz eksikliği tamir genidir. Çok sayıda polip mevcuttur. Bu hastalarda proksimal kolon tümörüne eğilim vardır. MYH-AP, APC mutasyonu bulunmayan FAP fenotipli ailelerin %7-8'ini oluşturabilir. Çok sayıda adenomalı ya da APC mutasyonu olmayan FAP fenotipli kişiler ile aile öyküsü otozomal resesif kalıtımla uyumlu olan hastalar MYH-AP için test edilmelidir (Steven ve Jonathan, 2010).



Şekil 4. Kolorektal karsinogeneze etyolojik yaklaşım

2.2.3. Çevresel Faktörler

Kolorektal karsinom gelişmiş ülkelerde daha çok görülürken Asya ve Afrika'da daha azdır. Özellikle yüksek ısıda pişirilen kırmızı et (heterasiklik aminler), şeker ve yağ (kolesterol) oranından yüksek kalorili, lifsel komponenti olmayan beslenme alışkanlığı, karsinojenlerle temas, safra asitleri, sigara, alkol, iyonize radyasyon, katkı maddeleri ve oksijen radikallerinin tümör oluşumunda önemli rolü vardır. Ayrıca taze sebzeler bol ve kaba lifli gıdaların, vitamin A, C, E, Beta Karoten ve

selenyum gibi antioksidanlar, kalsiyum ve balık yağı dışkıda mutajenlerin üretimini azaltarak kolon adenom ve kanserlerinin oluşmasını engeller.

2.2.4. Kolorektal Kanser Histolojik Yapı ve Patoloji

Kolorektal kanser histolojik yapısı;

-Tunika Mukoza: Mukoza yüzey epitelyumu, kripta, lamina propria ve lamina muskularis mukozadan oluşur. Barsağın bu bölümünde villus bulunmaz. Yüzey epiteli basit kollumnar veya küboidal epitelden oluşur. İntestinal bezler uzundur ve çok sayıda goblet ve emici (absorbativ) hücre, az sayıda enteroendokrin hücre ile karakterizedir. Epitelyal hücreler arasında T lenfositler mevcuttur. Lamina propria fibroblastlar, damarlar, sinirler, düz kas ve inflamatuvar hücrelerin gevşek bir kolleksiyonunu içerir. Lenfatikler lamina proprianın alt 1/3'lük bölümüne sınırlıdır. Normalde mevcut olan inflamatuvar hücreler, lenfositler, plazma hücreleri, mast hücreleri, eozinofil ve histiyositlerdir. Muskularis mukoza ince bir kas tabakasıdır. Mukozayı daha derin submukozadan ayırmaktadır.

-Tunika Submukoza: Lamina propnanın hücresel içeriği submukozal stromada da yer alır. İki nöral plexus submukozal bölgede yer alır. Bunlar Meissner submukozal plexus ve derin submukozal plesustur. Submukoza arteriolleri, venülleri ve lenfatikleri içerir.

-Tunika Muskularis: İçte sirküler, dışta langitudinal kaslardan meydana gelmiştir. Auerbach plexusu iki kas tabakası arasında uzanır. Dış longitudinal tabaka lifleri tenya koli denilen üç kalın langitudinal bant halinde toplanmıştır.

-Tunika Seroza: Çekum, appendiks, transver kolon ve sigmoid kolonu tam olarak sarar (intraperitoneal). Asenden kolon, desenden kolon ve rektumun bir bölümü ile anal kanal peritonun arkasında kalır (retroperitoneal).

-Patolojik evreler

KRK'ın gelişmesinde klinik olarak 3 evre olduğu gösterilmiştir.

1- Preneoplastik evre: kolonik mukozada hiperproliferasyon ve displazi

2- Prekanseroz evre: sırasıyla tubuler, tubulovillöz ve villöz adenom

3- Karsinom evresi: önce insitu, sonra invaziv karsinoma, daha sonra da metastaz gelişir.

- **Makroskobik Patoloji**

KRK'lar makroskobik olarak polipoid (proliferatif), ülseratif ve skiröz (annuler) olabilirler. Polipoid tip sıklıkla çekum, asandan kolon ve rektumda görülür. İleri dönemde neoplazm ülserleşir, kanamaya sebep olur ve ancak büyük kitleler tıkanma yaparlar. Çoğu zaman iyi diferansiye tümörlerdir. Annuler tümörler tipik olarak desenden kolon ve rektumun 1/3 üst bölümünde görülür. Bu tümörler barsak duvarını çevreleme ve onu daraltma eğilimindedirler. Annuler patolojilerin çoğu ileri dönemlerde metastaz yapma eğilimindedirler.

- **Kolorektal Kanselerde Yayılım**

Kolorektal kanserlerde hastalık ilerledikçe yayılım dokunun lenfatik ve kan dolaşımına bağlı olarak öncelikle duvarda, lenfatik ve venöz damarları da içine alacak şekilde devam eder. Kolorektal kanser lenfatik, venöz, direkt invazyon, intraluminal ve peritoneal implantasyon yolları ile yayılabilir.

- **Lokalizasyon**

KRK'ların %55-60'ı rektosigmoid, %15-20'si çıkan kolon ve çekum, %10-15'i inen kolon ve %5-10'u ise transvers kolonda yerleşir. Yüzde 5'i ise multisentrik yerleşimlidir.

- **Semptom ve belirtiler**

Genellikle özgül olmayan şikayetler ortaya çıkar. Rektal kanama, barsak alışkanlıklarında değişiklikler, karın ağrısı gibi şikayetler ortaya çıkar. Bunlar tümörün lokalizasyonu ve hastalığın evresi ile değişiklikler gösterir.

Sağ kolon tümörleri; barsak alışkanlıklarında belirgin değişikliğe yol açmaz, kanama daha ön plandadır. Sol kolon tümörleri; karnın alt kadranlarda ağrı, barsak alışkanlıklarında değişiklikler, kırmızı renkli rektal kanamalar, kilo kaybı, akut semptomlar ilk belirti olabilir. Obstrüksiyon perforasyon %10 hasta tam tıkanma ile başvurur.

-**Kolon ve rektum Kanseri Tanı**

- Öykü (aile hikayesi, barsak alışkanlığında değişme, kanama, mukus deşarjı, sancılı idrar, halsizlik, zayıflama, solukluk, efor kapasitesinin azalması)

- Fizik Muayene (solukluk, zayıflık, KC, karında kitle, inguinal LAP)

- Rektal Tuşe (kan, mukus, kitle)

- Simoidoskopi ve Kolonoskopi (polip, kanser, diğer kanama nedenleri)

- Çift kontrast kolon grafisi (kitle, omuz işareti, yenmiş elma manzarası, rijidite, çift kontur, darlık, obstrüksiyon)
- Sanal kolonoskopi
- Abdominal BT (kitle, duvar kalınlaşması, çevreye invazyon, LAPler, KC metastazı)
- ERUS (rektumda mukoza ve altına invaze kitle, LAP)
- CEA (postop dönemde yükselen CEA)
- Akciğer grafisi, toraks BT (Akciğer metastazı)

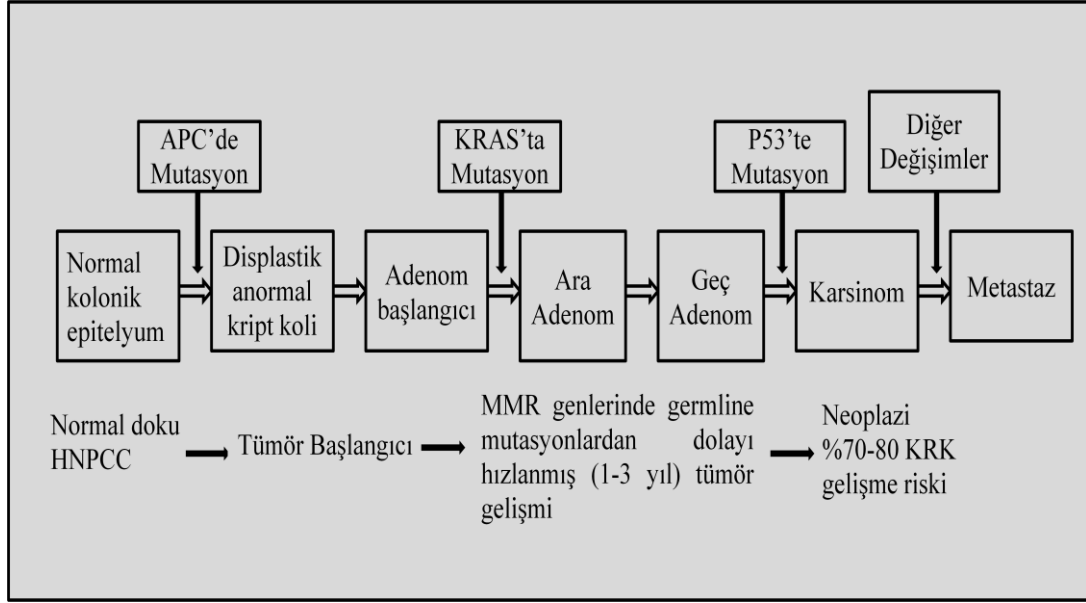
2.3. KOLOREKTAL KARSİNOGENEZ

Kolorektal karsinogenez, normal hücrenin malign hücreye dönüşümünde genetik ve epigenetik değişikliklerin rol aldığı çok basamaklı bir süreçtir. Bu süreçte her basamakta farklı lezyonlar gelişmekte ve böylece moleküler değişimlere farklı morfolojik lezyonlar eşlik etmektedir.

2.3.1. Kolorektal Karsinogenezin Moleküler Mekanizması

2.3.1.1. Adenom-Karsinom Ardışıklığı

Kolorektal kanser, normal glandüler epitelin invaziv kansere değişim gösterdiği genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimidir. Normal kolon epitelinin adenoma, invaziv kansere ve metastatik kansere dönüşümünü içeren basamaklar Vogelstein ve Fearon tarafından tanımlanmıştır. Bu model ilk tanımlandığında tübüler ve tübülovillöz adenomların karsinoma ilerlediği bildirilmiş, daha sonra sesil serrated adenomlar ve klasik serrated adenomların da kansere dönüşüm potansiyeli içerdiği gösterilmiştir. Bu polipler kansere dönüşüm için alternatif bir yol içermektedirler. Klasik ve sesil serrated poliplerin kansere dönüşümü, mikrosatellit instabilitesi (Microsatellite Instability=MSI) ve kromozom instabilitesi (Chromosomal Instability = CIN) şeklinde olmaktadır. CpG Adacıklarında Yoğun DNA Metilasyonu ve BRAF V600E mutasyonu mikrosatellit instabilitesi ile ilişkili bulunurken, tübüler adenomatöz poliplerin kanser dönüşümü ise adenomatöz poliposis koli (Adenomatous Polyposis Coli = APC) gen inaktivasyonu ve kromozom instabilitesi (kararsızlık) ile ilişkili olarak bulunmuştur (Şekil 5). Kolorektal karsinogenezde; CIN, MSI, CIMP ve yaygın DNA hipometilasyonu olmak üzere dört tip genomik ve epigenomik kararsızlık tanımlanmıştır. En önemli basamağıdır Genomik ve epigenomik instabilitedir. Genetik ve epigenetik değişikliklerin yaklaşık %90'ından fazlasının adenom karsinom ardışığı oluşturmaktadır.



Şekil 5. Adenom karsinom ardışığı; normal kolon epitelinin karsinoma dönüşümünde bir seri mutasyon.

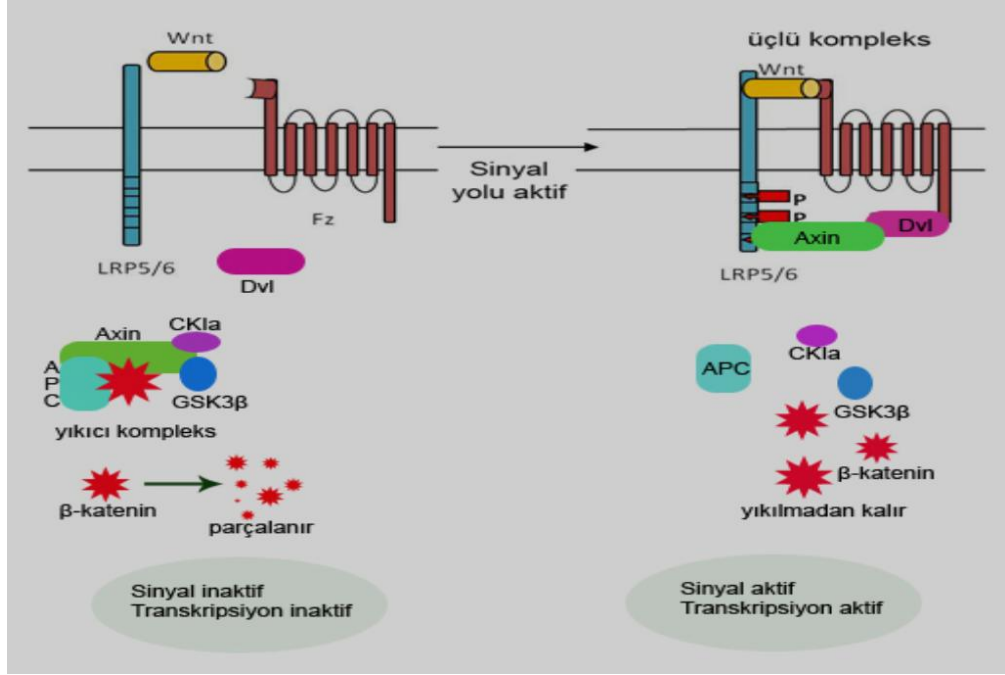
Tümör gelişimi sırasında ilk mutasyon bir onkogene ait ise ve APC ile p53 gibi tümör supresör genler aktif ise (mutasyon yok ise) hücre apoptoza gidecek tümör gelişimi baskılanmış olacaktır. Başlangıçta APC mutasyonu varsa displazi ve kanser gelişimi yolu açılacaktır. Buradaki önemli husus, APC geni sağlam olan bir kolorektal mukoza hücresinde herhangi bir onkogenin aktiflenmesi ile tümör gelişiminin mümkün olmadığıdır. Bu nedenle APC geni kolorektal kanser gelişiminde kilit role sahiptir.

2.3.1.2. Kolorektal Karsinogenezde Moleküler Ara Yollar

Kolorektal karsinogenezde, patogenetik olarak birbirinden farklı üç ara yol yer almakla birlikte, bu ara yolların her birinde, birden fazla mutasyonun aşamalı olarak birikimi söz konusudur. Ayrıca, bu ara yollarda yer alan genler ve oluşan mutasyonların birikim mekanizmaları birbirinden oldukça farklıdır (Hamilton 2000). Güncel çalışmalar, kolorektal karsinomlarının kromozomal instabilite ara yolu, mikrosatellit instabilite ara yolu üzerinden geliştiğini, diğerlerinin ise iki arayolla da ilişkili olmayıp, CpG ada metilasyon fenotipi arayolu üzerinden gelişebileceğini göstermektedir (Jass 2007).

2.3.1.2.1. Kromozomal İnstabilite (CIN) Ara Yolu

Baskılayıcı yolak olarak da bilinen bu ara yol, çeşitli onkogen ve supresör genlerde görülen seri mutasyonların birikimi sonucu oluşmaktadır. Delesyon, duplikasyon, kromozomal rearanjman gibi anöploidi ile sonuçlanan genetik değişiklikler içermektedir (Worthley ve ark., 2007). Kolon kanserinde genomik instabilitenin en yaygın tipi olan CIN, kolorektal tümörlerin %75'inde görülmektedir (Jass 2007). Bu arayolun morfolojik karşılığı ise adenoma-karsinoma sekansıdır. Fearon ve Vogelstein'in tanımladığı adenoma-karsinoma modeline göre, adenom gelişiminde erken dönemde, APC tümör supresör gen mutasyonları gözlenirken daha ileri evrede KRAS mutasyonları ve maligneteye geçişte ise, p53 mutasyonu ile 18q delesyonu söz konusudur (Vogelstein ve ark., 1988). Bu ara yolda 4 önemli sinyal iletim yolağı vardır; WNT, p53, RAS-MAPK ve TGF- β /SMAD. WNT sinyalleri, normal olarak büyümenin regülasyonunda, apoptozda, intestinal kök hücrelerin farklılaşmasında ve kısmen embriyogenezde etkilidir. WNT sinyal ara yolunda yer alan APC (adenomatöz polipozis koli) proteini, β -katenini parçalayarak sitoplazmadaki miktarını azaltır ve çekirdeğe geçişini engelleyerek büyüme sinyalini durdurur. APC genindeki germline mutasyonlar sonucu FAP sendromu ortaya çıkmaktadır. Sporadik kolorektal kanserlerin %80'inden fazlasında ise somatik hücrelerde APC gen mutasyonu saptanmıştır (Takayama ve ark., 2006), (Cheah 2009).



Şekil 6. Wnt/β-katenin sinyal mekanizması

P53 mutasyonu, insan tümörlerinin yaklaşık %50'sinde görülmekle birlikte, p53'te heterozigotluk kaybı hemen her kanser tipinde ortaya çıkmaktadır. P53 proteini normal hücre siklusunu kontrol etmez ancak, DNA zedelenmesi durumunda ekspresyonu artar ve DNA'ya bağlanarak pek çok genin transkripsiyonunu stimüle eder.

Hücre siklusu durunca p53, DNA onarımına yardımcı proteinlerin ekspresyonunu artırır ya da hasar onarılmadıysa hasarlı hücreyi apoptoz ile ortadan kaldırır. RAS-MAPK sinyal ara yolu, hücrede çeşitli hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiyasyon faktörleri tarafından kullanılır. Bu sinyal ara yolu, RAS proteininin aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla RAF, MEK ve ERK proteinleri aracılığıyla bir kinaz kaskadı oluşur. Ras proteininin aktif hale geçmesi için posttranslasyonel modifikasyondan sonra membrana yerleşmesi gerekir. Hücreye büyüme sinyali geldiğinde, Ras-GTP haline dönüşür. Aktif olan RAS, RAF proteinini harekete geçirerek mitogenez sürecini başlatır. RAS proteini, normal dokuda proliferasyon, diferansiyasyon ve senesens sinyallerinde önemli bir role sahipken, mutant genin oluşturduğu RAS proteini, birçok kanser tipinde etkili potansiyel onkojenik bir proteindir. Tüm insan tümörlerinin %17-25'inde, kolorektal tümörlerinse %30-40'ında aktive edici KRAS mutasyonu tanımlanmıştır. BRAF proteini, RAS proteini tarafından stimüle edilen ve RAS-MAPK sinyal ara yolunda görev alan bir diğer

moleküldür. Tüm insan tümörlerinin %8'inde, kolorektal tümörlerinse %5-12'sinde BRAF mutasyonu rapor edilmiştir. Ayrıca yanlış eşleşme tamir sistemi defektli olan kolorektal kanserlerde, defekti olmayanlara göre çok önemli ölçüde BRAF mutasyonu görülmektedir. Bu nedenle BRAF mutasyonu ile mikrosatellit instabilitesi arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir (Rajagopalan ve ark., 2002). TGF-Beta epitelyal hücreler için proliferasyon inhibitörü olarak işlev görmektedir. Hücrede TGF- Beta'nın büyüme inhibitör etkisine karşı oluşan duyarsızlık sonucu tümör gelişimi gözlenir. TGF-Beta sinyal ara yolunda yer alan ve bir tümör supresör gen olan SMAD geni, hem büyümenin regülasyonu hem de apoptozda etkilidir. Apoptozda SMAD geni gibi etkili olan bir diğer gen DCC genidir. DCC geninin mutasyona uğraması durumunda hücrenin apoptoz mekanizmasında aksaklıklar yaşanır.

2.3.1.2.2. Mirosatellit İnstabilitesi (MSI) Ara Yolu

Mutator ara yol olarak da bilinen mikrosatellit instabilite ara yolu (MSI), DNA yanlış eşleşme tamir genlerindeki mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Mikrosatellitler, genom boyunca yer alan kısa nükleotit tekrarlarıdır. Hücre bölünmesinde replikasyon sırasında bu tekrar dizilerinin olduğu kısımlarda DNA polimeraz hata yapabilir. Bu durum replikasyon hatası (replication error=RER) olarak adlandırılır. Hata, bir tekrarın atlanması, yanlış baz eklenmesi ya da fazla sayıda tekrar dizisi eklenmesi şeklinde olabilir. Normal şartlarda, DNA polimeraz 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi ile yanlış eşleşmeler düzeltilirken, onarımdan kaçabilen bu alanlar, yanlış eşleşme tamir sistemi aracılığıyla onarılır ve böylece DNA MMR genleri sayesinde replikasyon sürecinde genomik stabilizasyon sağlanır. Ancak MMR genlerinde bir mutasyon olması durumunda MSI olarak bilinen durum ortaya çıkar. Kolorektal tümörler, mikrosatellit instabilitesi açısından 3 grupta değerlendirilmektedir; Mikrosatellit-stabil (MSS), Yüksek mikrosatellit instabil (MSI-H) ve Düşük mikrosatellit instabil (MSI-L). MSS tümörlerin genetik profili, MSI-L ile çok benzerdir ancak, MSI-H tümörler oldukça farklı bir profil sergilerler. MSI-L tümörler, sol kolon yerleşimli ve en az MSS tümörler kadar agresif bir gelişim paternine sahiptir. Bu grupta en sık görülen genetik değişiklikler, KRAS ve p53 mutasyonları ile 5q, 17p ve 18q lokasyonlarında heterozigotluk kaybı olmakla birlikte, en karakteristik özellikleri bazı DNA MMR genlerinin kısmi metilasyonu ile genin susturulması ve O-6

Metilguanin-DNA Metiltransferaz (MGMT) geninin metillenmesi sonucunda protein ekspresyon kaybıdır (Hamilton 2000).

Hereditör Non-Polipozis Kolorektal Kanseri Sendromu seyrinde ortaya çıkan tümörlerin %90'ı, sporadik kolorektal tümörlerin ise %15-20'si MSI-H olarak tanımlanmıştır. Böylece, mikrosatellit instabilitesi için, HNPCC'de görülen MSI-H ve sporadik olarak görülen MSI-H kolorektal kanserler olmak üzere 2 farklı mutasyon gelişim modeli tanımlanmıştır.

Tüm kolorektal kanserlerin %5'ini oluşturan HNPCC Sendromu, otozomal dominant kalıtım göstermekle birlikte, germline mutasyon ya da yabancı tip olan alelin inaktivasyonu ile tümör gelişimi gözlenmektedir. Germline mutasyon durumunda, DNA yanlış eşleşme tamir genleri MSH2, MLH1, MSH6, MSH3, PMS2, PMS1, MLH3'de delesyon ya da nokta mutasyonu şeklinde genetik değişiklikler mevcuttur. Yüksek penetransa sahip olan bu genlerde mutasyon taşınması, kolorektal kansere yakalanma riskini %80'dir. Yabancı tip alelin inaktivasyonu durumunda ise, MMR genlerinden biri mevcut germline mutasyon ile heterozigot durumdadır. Knudson'un iki hit hipotezindeki fenotipik etkiye göre, MMR genleri tümör süpresör gen gibi davrandığından otozomal dominant kalıtım göstermektedir. Diğer alelin (yabancı tip alelin) inaktive edilmesi ile heterozigotluk kaybı olarak tanımlanan durum ortaya çıkmakta ve böylece, mikrosatellit instabilitesi oluşmaktadır. MSI-H sporadik kolorektal kanserlerin %90'ında MMR geninin promotor bölgesinde bialelik metilasyon ya da tek alelde hipermetilasyon ile tümör gelişimi gerçekleşmektedir. Genin promotor bölgesinde bialelik metilasyon olması durumunda yabancı tip olan her iki alelin metilasyonu ile gen tamamen susturulur ve protein ekspresyonu olmaz. Tek alelde hipermetilasyon olması durumunda ise, yabancı tip olan her iki alelden birinin metile edilmesi ile gen ekspresyonu baskılanarak azaltılır.

MSI arayolundan gelişen kolorektal kanserlere, genellikle serrated poliplerin öncülük ettiği düşünülmeyle birlikte, Lynch sendromunda adenom öncülüğünde ya da "de novo" kanserleşme olabileceği görüşü kabul edilmektedir.

2.3.1.2.3. CPG Adası Metilasyon Fenotipi (CIMP) Ara Yolu

CpG adaları, yüksek oranda guanin-sitozin dinukleotidleri içeren ve çoğunlukla genin promotor kısmında yer alan genom bölgeleridir. Tüm genomun %1'ini oluştururlar. CpG adaları, genlerin promotor bölgelerinde, 5' uçlarında görülür ve birçoğu transkripsiyon bağlanma bölgesi içerir (Kulis ve Esteller, 2010). İnsan promotorlarının %60'undan fazlasında CpG adasının yer aldığı saptanmıştır. Promotor bölgelerde görülen CpG adaları, normal koşullarda aktif olan bir gende metillenmemiştir. Bu bölgelerin metillenmesi sonucu ilgili gen susturulur ve protein ekspresyonu gerçekleşemez (Jones ve Baylin, 2007). DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilen enzimatik bir modifikasyondur. Sitozin nükleotidinde metil grubunun bağlanması guanin ve sitozin baz eşleşmesini etkilemez. Ancak metil gruplarının dışarı doğru çıkıntı yapması, transkripsiyon için gerekli DNA-protein etkileşimini engellediği için gen ifade edilemez ve böylece gen susturulmuş olur. Bu durum, mitoz bölünmeler ile yeni hücrelere de aktarılır. Bu nedenle, CpG adacıklarının metilasyonunun, epigenetik (gen ifadesindeki değişikliklerin, DNA sekansı ile bağlantı göstermeksizin, hücre bölünmesi boyunca bir nesilden diğerine aktarılması) bir durum olduğu düşünülmektedir.

CIMP arayoluyla gelişen kolorektal tümörlerde mikrosatellit kararsızlığı ya da kararlılığı olabilir. Bu tümörlerin çoğu, serrated neoplazi sekansında, serrated poliplerden gelişmektedir. Kolorektal karsinomların %20'sinin CpG hipermetilasyonu, %20'sinin düşük düzeyde CpG metilasyonu gösterdiği %60'ının ise CpG metilasyonu göstermediği izlenmiştir (Jass ve Baylin, 2007). Kolorektal karsinomların CIMP durumu, genellikle MSI durumu ile ve KRAS ve BRAF gen mutasyonları ile ilişkilidir. Buna göre, MSI-H ve BRAF gen mutasyonu gösterenler, CIMP1 grubu, MSS ve KRAS mutasyonu olanlar ise CIMP2 grubu olarak değerlendirilmektedirler (Hamilton 2000).

2.4. KOLOREKTAL KANSERDE EVRELEME

Evreleme sisteminin amacı yayılımı belirlemek, sağ kalımı tahmin etmek, tedaviyi belirlemek, farklı merkezlerdeki hastaları ve tedavileri karşılaştırmaktır. Kolon kanserinde evrelemede; Duke's sınıflaması, Astler Coller sınıflaması, ve TNM (Tümör Nod Metastaz) sınıflaması olmak üzere üç farklı sınıflama kullanılmıştır. Ancak günümüzde Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC)

tarafından geliştirilen (Tablo 5), Uluslar arası kanser birliği (UJCC)'nin onayladığı TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır (Robert 2010)

1932'de Dukes, rektal karsinomların evrelemede yeni bir sistem oluşturdu ve bu kolon karsinomlarına da uygulandı. Bu sınıflama, tümörün derinliği, lenf bezi tutulumu ve uzak metastaz bulunmasına göre A, B, C olarak yapılmıştır. Daha sonra 1954 yılında Astler ve Coller tarafından başka bir evreleme sistemi geliştirilmiştir. Temelde Dukes sistemine benzemekle birlikte, derinlikleri farklı olan tümörlerde lenf düğümü tutulumunu da değerlendirmesiyle farklılık göstermektedir. Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) ve Uluslararası Kanser Birliği (UICC)'nin tümör, lenf düğümü ve metastaz komponentlerini gruplandırmasıyla ortaya koyduğu TNM sınıflaması (Tablo 4), daha ayrıntılı bir sınıflama olup kolaylıkla diğer sınıflama sistemlerine çevrilebilir.

TNM; Evre 1=Dukes A, Evre 2=Dukes B, Evre 3=Dukes C, Evre 4=Dukes D
Günümüzde halen bu sınıflamaya göre tedavi kararı verilmektedir.

Tablo 4. Kolorektal kanserlerde TNM evrelemesi

Primer Tümör (T)	
Tis	: Karsinoma in situ; intraepitelyal veya lamina propia invazyonu
T1	: Tümör submukozayı invaze etmiş
T2	: Tümör muskularis propriayı invaze etmiş
T3	: Tümör muskularis propriayı geçerek serozaya kadar ulaşmış
T4a	: Tümör visseral peritonu invaze etmiş
T4b	: Tümör diğer organları veya yapıları invaze etmiş.
Lenf Nodu Metastazı (N)	
N0	: Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	: 1-3 bölgesel lenf nodu metastazı mevcut
N1a	: 1 bölgesel lenf nodu metastazı mevcuttur.
N1b	: 2-3 bölgesel lenf nodu metastazı mevcut
N1c	: Subserozal, mezenterik ya da peri kolik dokuda tümör deposit varlığı
N2	: 4 veya daha fazla lenf nodu metastazı mevcut
N2a	: 4-6 lenf nodu metastazı mevcut
N2b	: 7 ve daha fazla lenf nodu metastazı mevcut
Uzak Organ Metastazı	
M10	: Uzak metastaz yok
M1a	: Sadece bir organda metastaz varlığı
M1b	: Birden çok organ ya da periton metastazı varlığı

Tablo 5. KRK TNM Evreleme Sistemleri (AJCC 2010)

Evre	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2- T3	N2a	M0
	T1- T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Tx	Nx	M1a
IVB	Tx	Nx	M1b

3. KANSER VE EPİGENETİK

Kanser, kimyasal etkenler, radyasyon maruziyet gibi faktörleri aracılığıyla hücre bölünmesi kontrol mekanizmaları zarar gören hücrelerin kontrol dışı aşırı bölünmesiyle karakterize edilen bir hastalıktır (Jackson ve Bartek, 2009). Sosyo-ekonomik olarak ileri düzeyde ülkelerde birinci, henüz gelişmekte olan ülkelerde ise ikinci ölüm nedeni olan kanser hastalığında 2008 yılında 12,7 milyon yeni vaka ve 7,6 milyon ölüm vakası olduğu açıklanmıştır. Bu yeni vakaların %56'sı ve ölümlerin %64'ü ekonomik olarak gelişmekte olan ülkelerde görülmüştür (Jemal ve ark., 2011). Hücrenin DNA diziliminde mutasyonlar (nokta mutasyonları, delesyonlar, insersiyonlar, gen füzyonları, kromozomal tekrar düzenlenmeler) insan yaşamı boyunca olmakta ve bu değişiklikler birikmektedir. Bazen gerçekleşen mutasyonlar iyi huylu olup somatik mozaizime neden olur, bazen de kanser gibi ölümcül hastalıklara sebep olabilmektedir (Podlaha ve ark., 2012). Klasik bakış açısıyla kanser, sürekli gerçekleşen mutasyonların zaman içerisinde birikerek, kompleks ve çok faktörlü mekanizmalar sonucunda normal hücrenin malignant hücreye dönüştüğü şeklindeydi (You ve Jones, 2012). Epigenetik mekanizmaların aydınlatılmasıyla bu klasik düşünceler değişmiştir ve böylece epigenetik mekanizmaların da kanser etiolojisinde rol aldıkları keşfedilmiştir (Chervona ve Costa, 2012), (Podribny ve Rusyn, 2013). İnsan DNA'sında 3,2 milyar nükleotid ve bunların da yaklaşık 25 000 gen taşıdığı bilinmektedir (Holwerda ve de Laat, 2012). Genetik bilgiyi taşıyan DNA, hücre çekirdeğinde histon proteinleriyle birleşerek kromatin yapısını oluşturmaktadır. Kromatinin en küçük fonksiyonel birimi olan nükleosomlar, 147 baz çiftinin ikişer molekül H2a, H2B, H3 ve H4 proteinlerinin etrafını yaklaşık 2 turla sarmasıyla oluşur. Kromatin heterokromatin ve ökromatin olarak ikiye ayrılabilir. Heterokromatin daha yoğundur ve aktif olmayan genleri içerir. Ökromatin ise kısmen daha gevşektir ve aktif genleri içerirler (Dawson ve Kouzarides, 2012). Kromatinin üç boyutlu yapısı ve üzerindeki değişiklikler genleri aktif ve pasif hale geçmesini etkilediği uzun yıllardan beri bilinmektedir. Gelişen teknoloji ve uygun ekipmanlar sayesinde son zamanlarda yapılan araştırmalarda histon proteinleri üzerinde olan bu posttranslasyonel değişikliklerin tahminlerden çok daha fazla sayıda ve çeşitlilikte olduğunun fark edilmesiyle, bu değişikliklerin fonksiyonu araştırmacıların merak konusu olmuştur. 1940 yılında Conrad Hal

Waddington tarafından ortaya atılan ‘‘Epigenetik’’ terimi, fenotipi ortaya çıkmasını sağlayan genleri ve bunların ürünleri arasındaki etkileşim olarak tanımlanmıştır (Waddington 2012). Günümüzde ise epigenetik, gen ifadesindeki değişikliklere neden olan mayoz ve mitoz bölünmeyle kalıtılabilen mekanizmaları inceleyen bilim dalı, başka bir deyişle gen ekspresyonuna bağlı kalıtsal bilgi olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik mekanizmalar tersinir olması yani birey kendi epigenetik profilini değiştirebilmekte ve oluşturduğu epigenetik profili bir sonraki nesle aktarabilmektedir (Hassler ve Egger, 2012), (Gerhauser 2012). Aynı zamanda DNA diziliminde değişikliklere neden olan genotoksik mekanizmaların aksine epigenetik mekanizmalar DNA dizilimini değiştirmeden gen ifade seviyesini düzenlemektedir. Daha açıklayıcı olarak ifade edilirse bazı genlerin ifadesinin kontrolü epigenetiğin grevevidir ve bunu DNA’nın temel yapısını değiştirerek değil, DNA ile bağlantılı olan kromatin proteinlerini ya da DNA’yı etkileyerek gerçekleştirir. Yani epigenetik, transkripsiyon faktörlerinin DNA’ya ulaşmasını engelleyecek mekanik değişiklikler yaratarak gen ifadesini kontrol eder. Organizmalarda meydana gelen X kromozomu inaktivasyonu, genomik baskılama, kromozomal kararsızlık, hücre farklılaşması ve gen ifadesi seviyesi gibi olaylar epigenetik mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir. Bununla birlikte gıda, annenin davranışları gibi çevresel faktörler de epigenetik mekanizmaları kolayca etkileyebilmektedir (Martín-Subero ve ark., 2011). Epigenetik mekanizmalar, aynı ortamda büyüyen ve aynı genetik yapıya sahip iki bireyin nasıl farklı fenotiplere sahip olduğunu açıklar (Sandoval ve Esteller, 2012). DNA, ekirdek içerisinde histon proteinleri ile birlikte nükleozom birimlerini oluşturur ve böylece genetik materyal, düzenli bir biçimde paketlenerek kromatin yapısı meydana gelir. Kromatin yapısında kovalent ve kovalent olmayan modifikasyonlar gerçekleşir. Yüksek yapılı ökaryotların çoğunda ise DNA’nın kendi kendini kovalent olarak değiştirmesi mümkündür. Bunu sitozin bazlarının metilasyonu ile gerçekleştirir. Bu mekanizmaların hepsi birbiriyle iç içe geçmiş yolakları içerir ve kromatin yapısındaki varyasyonları oluşturur. Bu nedenle tamamen aynı oldukları düşünülen tek yumurta ikizlerini birbirinden ayıran moleküler mekanizmalar epigenetiğin bir ürünüdür. Ayrıca kardeş kromatitlerin üzerindeki epigenetik farklılıkların gen ifade düzeylerine farklılıklara sebep olabileceği düşünülmektedir (Lansdorp ve ark.,

2012). Hatta epigenetik mekanizmaların, karsinogenezin ilk safhalarında yoğun olarak meydana geldiğinden kanser başlangıcında etkili olduğu düşünülüp, epigenetik temelli kanser tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi yeni hedef haline gelmiştir (Carone ve Lawrence, 2012), (Hatzia-postolou ve Iliopoulos, 2011). Literatürde taramalarındaki araştırma çalışmaları sonucunda epigenetik mekanizmaların prostat, tiroid, mide, beyin, akciğer, mesane (Kim ve Kim, 2012), kolon, over, kolorektal ağız, deri ve meme kanserlerinde rol aldığı bulunmuştur. Aynı zamanda normal kök hücrelerinin kanser kök hücrelerine özelleşmesinde de etkili olduğu görülmüştür. Üzerinde en fazla araştırma yapılmış epigenetik mekanizmalar DNA metillenmesi, histon değişiklikleri ve miRNA (mikro RNA)'dır. Özellikle DNA metilasyonu ve kromatinin yapısında bulunan histon proteinlerinin modifikasyonu malin dönüşümde önemli rol oynamaktadır. Metilasyonda, bir guaninle komşu olan sitozinin (CpG dinükleotidi) 5' pozisyonunda bulunan karbon atomuna bir metil grubu eklenmektedir. CpG dinükleotitleri birçok genin promotör bölgesinde sık olup "CpG adaları" halinde bulunurlar. Genin aktif kalabilmesi için bunların metillenmemiş (demetile) durumda korunması gereklidir. Genin normal olarak inaktif olması gereken hücrelerde ve kadındaki inaktif X kromozomunda ise CpG adaları metile durumdadır.

3.1. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar transkripsiyonel ve post transkripsiyon olmak üzere iki temel mekanizma içerir. Transkripsiyonel mekanizmalar; histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu ile epigenetik regülasyonda genomik imprinting, X inaktivasyonu ve genomun yeniden programlanmasında görev almaktadır. Post-transkripsiyonel mekanizma; RNAi esas olarak transkripsiyon düzenleyicilerinin DNA'ya erişimini etkilerler. Fosforilasyon, ubiquitinasyon, yüksek mobilitateye sahip histon olmayan (non-histon) proteinlerin varlığı ve asetilasyon ise nükleoproteinler düzeyinde (histon-nonhiston) yapılan epigenetik modifikasyon mekanizmaları olup gen ekspresyonu farklılaşmasında rol alan en önemli mekanizmalardır.

3.1.1. Transkripsiyonel Mekanizmalar

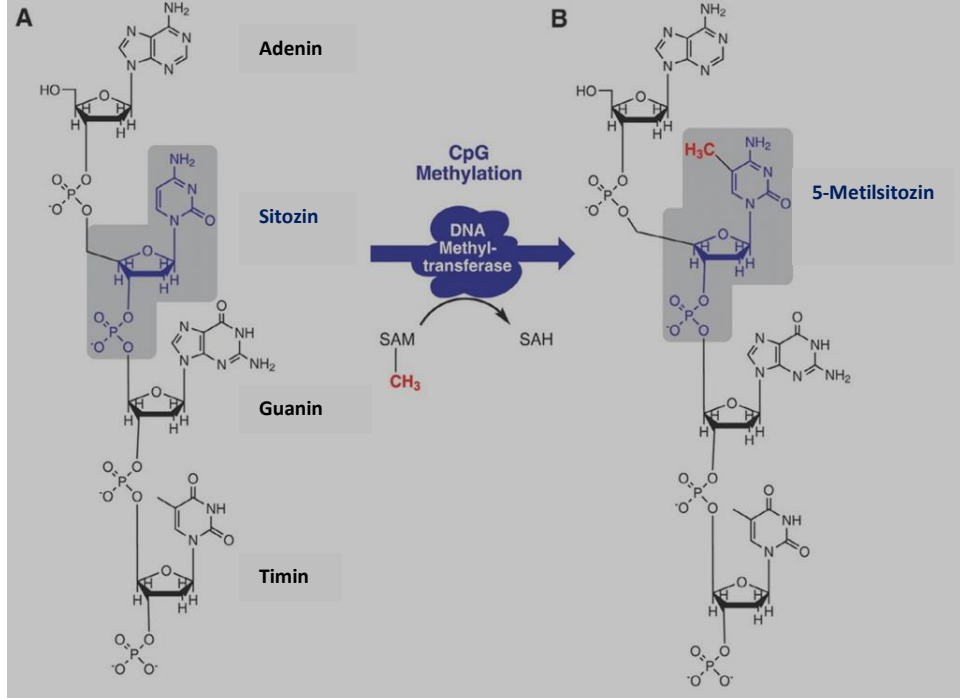
3.1.1.1. Histon Modifikasyonları

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

Tüm bu mekanizmalar, 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; histon asetil transferazlar tarafından asetillenme ve histon metil transferazlar tarafından metillenme yer almaktadır. 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 kromatinin ökromatik ya da heterokromatik durumu gözetilerek gen aktivitesi ya da inaktivitesinde markır olarak kullanılabilir. H3 ve H4 histon lizin rezidülerinin asetilasyonu, aktif gen çalışması yani ökromatik durumla gösterilebilirken, deasetilasyon ise kromatinin daha sıkı paketlenmiş 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 markır olarak kullanılabilir. Histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ile birlikte çalışarak gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol alırlar. 5-metil sitozin varlığı, bulunduğu kromozom bölgesinde lokalize olan genlerin sessizleşmesine yol açar. Hücrede pek çok mekanizmanın düzenlenmesinde replikasyon, transkripsiyon, DNA tamir, rekombinasyon ve gen transpozisyonunda görev alır.

3.1.1.2. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, gen baskılanmasıyla bağlantılı olan bir mekanizmadır. Üzerinde en fazla çalışma yapılan ve ilk bulunan epigenetik değişiklik DNA metillenmesidir (Goldberg ve ark., 2007), (Lister ve ark., 2009). DNA metilasyonu kovalent kimyasal bir modifikasyondur ve sitozin halkasının 5. pozisyonundaki karbon atomuna bir metil grubunun (-CH₃) eklenmesiyle gerçekleşir (Goel 2010). Normalde DNA'da bulunan sitozin, en sık gözlenen mutasyon mekanizmalarından biri olan deaminasyon sonucu urasile dönüşür ve bir RNA bazı olması nedeniyle onarım mekanizmalarınca (urasil glikozilazlar) tanınarak onarılmaktadır. Buna karşılık metilsitozinin kendiliğinden deaminasyonu sonucu oluşan timin, normalde de DNA'da bulunan bir baz olduğu için onarım mekanizmalarından kaçır. Bunun sonucu başlangıçta DNA çift zincirinde bulunan C-G ikilisi T-A ikilisine dönüşmesiyle sonuçlanır (Sayın 2008). Sitozin nükleotidinin metillenmesi, gen ifadesi ile direkt bağlı olup birçok ökaryot canlıının gelişiminde, normal ve hastalık durumunda büyük rol oynar (Umer ve Herceg, 2013). Başta housekeeping genler olmak üzere insan DNA'sında bulunan genlerin hemen hemen %60-70'inde CpG adacıkları vardır (Antequera ve Bird, 1993), (Portela ve Esteller, 2010). CpG adacıkları promotör bölgelerinin yanısıra 3' bölgelerde ve gen yapısında (ekzonik CpG) bulunabilir (Nguyen ve ark., 2001). Memelilerin genomunda CpG dizileri rastgele biçimde dağılmıştır ve çoğunlukla CpG yoğunluğunun az olduğu bölgeler ya da Alu elementleri gibi tekrarlayan DNA bölgeleri metillenmiştir. Aksine, genlerin promotör bölgesinde 0,5-3 kb (genellikle 200 baz çiftinden uzun) uzunluğunda ki CpG dinükleotince zengin bölgeler (CpG frekansı en az 0,6'dır) metillenmemiş şekilde bulunur. Genellikle CpG adacıklarında 5-Metilsitozin görülmekle birlikte, CpA ve nadir olarak CpT de de görülebilir. Fakat bunlar somatik hücrelerde görülmez, embriyonik kök hücrelerde görülmektedir (Kulis ve ark., 2010). DNA metilasyonu, genellikle genetik suskunluğa sebep olmaktadır (Smallwood ve Kelsey, 2012). Kısaca CpG adalarının metilasyonu; gen delesyonu ya da inaktive edici mutasyonlara eşdeğer fonksiyon ile genin susturulmasına neden olur. Bu adacıkların belirli gruplarının metilasyonuna normal dokuda rastlansa da genellikle normal hücrelerde metillenmemiş halde bulunmaktadır.



Şekil 7. CpG metilasyon mekanizması, (A) Sitozin bazındaki nükleotidleri içeren CpG adacığı, (B) DNMT'lar tarafından katalizlenen CpG adası metilasyonu; S-adenozil metiyonin (SAM-CH₃)'den sitoz bazına metil grubu transferi.

Anormal DNA metilasyonun; hipermetilasyon, hipometilasyon ve baskılama kaybı olmak üzere üç türü vardır. Tarihsel olarak kanserlerde saptanan ilk epigenetik anomali hipometilasyondur. Kolon kanserinde, tümör DNA'sında normal mukozaya kıyasla yaygın hipometilasyon olduğu saptanmıştır (Feinberg ve Vogelstein, 1983). Genomik global hipometilasyon normalde suskun olan genleri aktifleştirerek kromozomal kararsızlığına neden olarak tümör gelişimine yol açabilir. Ayrıca tümör gelişimi boyunca hipometilasyon derecesi artmaktadır (Fraga ve ark., 2004), (Ehrlich 2009). Bugüne kadar yapılan araştırmalarda, spesifik genlerin ve global hipometilasyonun meme (Gupta ve ark., 2003), boyun (Badal ve ark., 2003), yumurtalık (Gupta ve ark., 2003), kolorektal (Kim ve ark., 2006), miyeloid lösemi, prostat (Bedford ve van Helden, 1987), (Brothman ve ark., 2005) ve mesane (Seifert ve ark., 2007) gibi kanserlerde rol oynadığı bulunmuştur. Tümör supresör genler gibi kanser oluşumunda rol alan genlerin CpG adacıkları hipermetillendiğinde, genler inaktif forma geçer ve kanser oluşumuna sebebiyet verebilir (Jones ve Baylin, 2007). Bu nedenle gen promotör bölgelerinde bulunan CpG adacıklarının

hipermetilasyonu kanserde en fazla çalışılan epigenetik değişikliktir. Yeni nesil Sekans (NGS-Next Generation Sequence) gibi yeni yöntemler kullanılarak yapılan araştırmalar sonucunda normalde metillenmemiş durumdaki CpG adacıklarının %5 ile %10'unun çeşitli kanser türlerinde anormal metillendiği gösterilmiştir (Baylin ve Jones, 2011).

3.1.1.2.1. DNA Metilasyonunun Görevi

DNA metilasyonunun görevi net olarak anlaşılamamıştır. Ancak gen ifadesinin kontrolü, kromozomal bütünlüğün kontrolü ve rekombinasyonel olayların kontrolü rollerine sahip olduğu düşünülmektedir. Günümüzdeki verilere göre, DNA metilasyonunun; retroviral elementler ve Alu'lar gibi genomdaki parazitik sekanslara karşı ilkin savunma mekanizması görevini üstlendiği düşünülmektedir. Embriyogenezisin erken evrelerinde DNA metilasyon paternleri sıfırlanır ve gelişimin erken dönemleri boyunca yeniden kurulur. Sonrasında, nispeten sabit kaldığı düşünülmektedir. Pek çok metiltransferaz enzimi, demetilazlar, muhtemelen DNA yapısıyla alakalı olan ve DNA metilasyonuna neden olan metilasyon merkezleri, CpG adacıklarına bağlanarak onları metilasyondan koruyan transkripsiyon aktivatör proteinlerini içeren metilasyon-koruma bölgeleri içermektedirler. Metilasyon modelinde, başlangıç olarak gelişim boyunca metilasyon varlığı tespit edilir, DNA metilasyon paternleri sabitlenir ve daha sonra DNA metiltransferaz enziminin bakım aktivitesi sürekli devam eder. DNA metiltransferaz enzimi bu modelde, yeni sentezlenmiş ve yarı metilenmiş DNA'yı tanır ve seri bir şekilde tamamını metilenmiş duruma çevirir. Memelilerde DNA metilasyonunun görevini anlamak için fare model olarak kullanılmıştır. Bu modelde, primordial germ hücreleri, embriyonik kök hücreler ve blastosit hücreleri ölçülebilir DNA metilasyonu olmadan normal bir şekilde geliştikleri görülmüştür. Ancak kök hücreler farklılaşmaya başladığı dönemde DNA metilasyonu kusursuz gelişim için gerekli hale gelmektedir. Anne ya da babanı kromozomlardaki spesifik genlerden yalnız birinin ifade olması anlamına gelen genomik imprinting de DNA metilasyonunu içermektedir. Sitozin metilasyonu aynı zamanda X-kromozom inaktivasyonundan da sorumludur DNA metilasyonunun aynı zamanda yaşlanma sürecini de içerdiği düşünülmektedir. Konak memeli hücrelerinin genomuna birleştiren viral DNA'nın metilasyon tarafından inaktivasyona uğratılması, bu

yöntemin enfeksiyon ajanlarına karşı bir koruma mekanizması olarak görev aldığını göstermektedir.

3.1.1.2.2. DNA Metilasyonu ile Gen İfadesinin Düzenlenmesi

Birçok ökaryotik organizmanın DNA'sı metil gruplarının enzim aracılığı ile bazlara ve şekerlere eklenmesi yoluyla, replikasyondan sonra değiştirilir yani post sentetik modifikasyondur. Bazların metillenmesi genellikle sitozinden olur ve belirli herhangi bir ökaryotik organizmanın sitozinlerinin yaklaşık %5'i metillenir. Ancak, metilasyon derecesi dokuya özgüdür olup, %2'den %7'nin üzerine çıkacak şekilde değişiklik göstermektedir. 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 reseptörün operatöre olan ilgisinde fark edilebilir bir değişiklik meydana getirebilir. 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 (Michalowsky 1989).

3.1.1.2.3. DNA Metilasyonunu Gerçekleştiren Enzimler

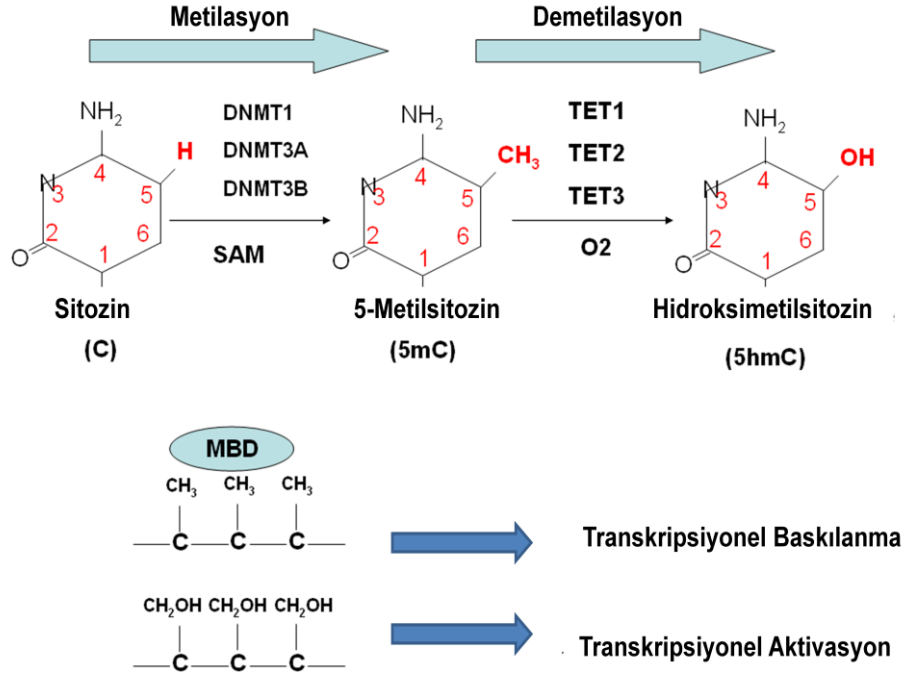
Hücre yaşamını, proliferasyon ve diferansiasyonunu sıkı kontrol altında tutan birçok genin önünde CpG adası vardır. İnsan genomunda genler arasında bulunan tekrar dizilerinin metilasyonu da görülebilmektedir (Li ve ark., 2010). Bu mekanizma, DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri tarafından metil bağlanma proteinleri aracılığıyla (MBD1, MBD2, MBD3 vb.) aktive edilir (Klose ve Bird, 2006), (Miller ve Sweatt, 2007). Bugüne kadar tanımlanan DNMT; DNMT1, DNMT1b, DNMT1o, DNMT1p, DNMT2, DNMT3A, DNMT3b, ve DNMT3L (Robertson 2002). Memelilerde en fazla bulunan DNMT1 yarı metillenmiş (bir zincirdeki CpG metillenmiş, diğer zincirdeki ise metillenmemiş) DNA'nın metillenmesinde görevlidir (Li ve Tollefsbol, 2010) aslında hem *de novo* hem de devamlılığı sağlayan metiltransferaz aktivitesine sahiptir ve DNMT3A ile DNMT3b güçlü *de novo* (DNA zincirlerinin her ikisinde metillenmemiş) metiltransferazlardır. (Okano ve ark., 1999), (Holz-Schietinger ve Reich, 2010) Katalitik aktiviteye sahip olan DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B aksine DNMT3L metiltransferaz aktivitesi göstermezler. DNMT3L, DNMT3A ve DNMT3B enzimlerinin aktivitesini

düzenlemek yoluyla de novo metilasyonunu katalizlerler (Jurkowska ve ark., 2011). DNMT'lere ilave olarak metilasyon mekanizmalarında görev alan önemli bir enzim grubu da demetilazlardır.

CpG adacıklarının hipermetilasyonu DNMT enzimlerinin aşırı ifade edilmesiyle gerçekleşmektedir. Meme (Girault ve ark., 2003), (Ben Gacem ve ark., 2012), over (Chen ve ark., 2005) ve mesane (Nakagawa ve ark., 2003) gibi kanser türlerinde DNMT enzimlerinin aşırı ifade edildiği bildirilmiştir. Bu durum DNMT enzimlerini kanser tedavi yöntemi geliştirilmesinde yeni hedef haline getirmiştir. DNMT inhibitörü olarak 5-aza-deoksisitidin (5-azadeoxycytidine) ve zebularine gibi ajanlar kullanılmaktadır (Gros ve ark., 2012). DNMT inhibitörü kullanılarak meme (Billam ve ark., 2010), miyeloid lösemi (Flotho ve ark., 2009) gibi kanserlerde hipermetilasyon nedeniyle susmuş olan genlerin tekrar aktive edilebileceği kaydedilmiştir. Bu ajanların yanı sıra antisens oligonükleotit kullanılarak DNMT enzimleri inhibe edilmiştir (Yan ve ark., 2003). Bütün bu yapılan araştırmalar sonucunda global hipometilasyon ile spesifik genlerin hipermetilasyonunun tümörogenesiste gerçekleşen genel özellikler olduğu kabul edilmiştir (Jaenisch ve Bird, 2003), (Arasaradnam ve ark., 2008). Anormal DNA metilasyonu, kanser ve Fragile X sendromu gibi hastalıklar ile çevresel faktörlerin etkisiyle belki yaşlanmada da rol aldığı düşünülmektedir (Cedar ve Bergman, 2012).

Son araştırmalarda promotör bölgesindeki CpG adacıkları yanı sıra gen yapısında bulunan CpG adacıklarının metilasyonunda transkripsiyonel aktiviteyi etkilediği, ilgili geni aktive ettiği (Ndlovu ve ark., 2011) ve bunların metil transferaz uygulamaları ile geri döndürülebildiğini böylece tedaviye yönelik yeni hedef mekanizma olabileceği gösterilmiştir. Metilasyon ile gen aktivasyonunun değiştirilmesi, Knudson'un "çift vuruş" hipotezine alternatif bir yol sunmaktadır. Daha farklı yaklaşımlarla kanser hücre hatları ile yapılan çalışmalarda, tümör supresör genlerin CpG adalarının metilasyonunun heterozigozite kaybıyla bağlantılı olması, hipermetilasyonun karsinogeneze katkısını desteklemektedir. Karsinogenezde, potansiyel olarak etkilenen yollarda bulunan genlerin metilasyon durumlarının kolon kanserinde araştırılması, tümörün klinik davranışı ile gen veya genlerin birlikte değerlendirilmesi önemlidir. Kanser başlangıcı ve ilerleyişini gösterecek epigenetik değişikliklerin açıklanması, bu değişikliklerin

mekanizmalarının belirlenmesine ve bu bilginin de hastalığın erken tanısına yardımcı olacağı ve hastalığı önleyici çalışmalara katkı sağlayacağı umut edilmektedir.



Şekil 8. Sitozin bazında genomik DNA metilasyonu ve demetilasyonu

3.1.1.3. Tümör Baskılayıcı Genlerin Promotor Bölgelerinin Metilasyon profili

Tümör supresör genin hipermetilasyonu, gen ifadesini baskılayan epigenetik bir mekanizmadır ve ilk kez sporadik insan retinoblastomasına neden olan RB geninde rapor edilmistir. İnsan tümörlerinde bazı CpG adaları metillenir ve ilişkili olan genin ifadesi kapatılır. Bu anormallik tümör supresör geni etkiliyorsa hücreye seçici bir avantaj sağlayabilir ve bu özellik nesiller boyunca seçilebilir. Kanser hücrelerinde, hücre döngüsü inhibitörü olan p16 geni, p53 regülatörü olan p14 geni, DNA tamir genlerinden olan BRCA1 ve MGMT genleri gibi kanser patolojisi ile ilişkili pek çok gen, metilasyon mekanizmasıyla sessizleşirler. Birçok tümör bir ya da birkaç gende birkaç çeşit hipermetilasyon gösterebilir. Genlerin CpG adalarının metilasyonu tümör tipine göre değişim göstermektedir. Örneğin, her bir tümör tipinin kendine özgü CpG adası metilasyon profili vardır. DNA metilasyon profili, tümörlerin seyrine veya tedaviye hassasiyetlerine göre sınıflandırılmasında yararlı olabilir.

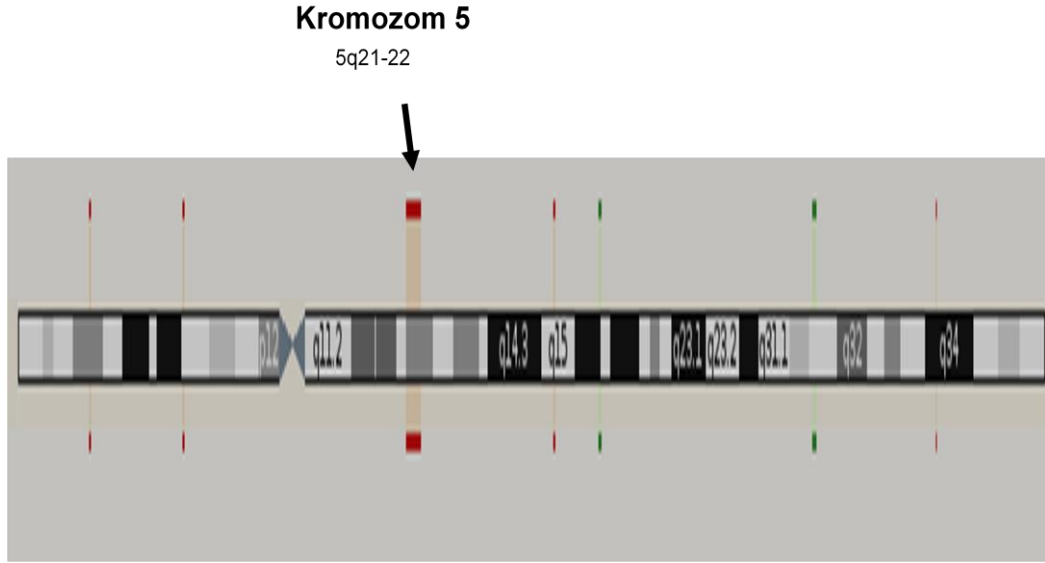
Daha önce yapılmış geniş ölçekli çalışmalardan biri akciğer kanserinde yapılmış ve 40'tan fazla 15 genin DNA metilasyonunda değişimler bulunmuştur. Oldukça sık hipermetilasyona uğrayan genlerin RAR- β , RASSF1A, CDNK2A, CHD13 ve APC olduğu görülmüştür. Bazı tümör tiplerinde, genlerin metilasyona uğrama sıklığı diğer tümörlerden daha fazla olmaktadır. Örneğin, gastrointestinal sistemde (özefagus, mide, kolon) meydana gelen tümör tiplerinde 60etilenmiş genler daha fazla görülürken rahim kanserinde genlerin metilasyona uğrama sıklığı daha azdır (Esteller 2001).

3.2. APC (Adenomatous polyposis coli) GENİ

APC geni insan genomunda ilk defa 1987 yılında, 5. kromozomun (5q21 - 22) uzun kolunun ortasında keşfedilmiştir (Bodmer ve ark., 1987). Daha sonra bu gen 1991 yılında bir Familial adenomatöz polipozis hastasının periferik kanından mutasyona uğramış şekilde izole edilmiş ve en geniş tümör baskılayıcı gen ailelerinden biri olarak literatüre geçmiştir (Nakamura ve ark., 1991), (Grodin ve ark., 1991). APC geni 21 ekzon içerir ve oldukça büyük bir gen olup yaklaşık 8500 bp büyüklüğündedir. Moleküler ağırlığı 312 kD olan 2843 amino asitten oluşan bir protein kodlar. Ekzon bölgeleri içerisinde en önemli olan bölge hem somatik hem de germline mutasyonların sık görüldüğü 15. ekzondur. Ekzon 15, APC genin kodlayıcı sekanslarının %75'inden fazlasını kapsamaktadır. APC geni, hücrenin tümör kitlesini oluştururken geçirdiği hücrenel olaylarda kritik rol oynayan APC proteinini ifade eder ve otozomal kalıtılan bir tümör baskılayıcı gendir. APC proteini Wnt sinyal yolağının antogonisti olarak davranır bu şekilde hücrenin tümör kitlesini oluştururken geçirdiği hücrenel olaylarda kritik rol oynamaktadır.

Hücre döngüsünü, hücrelerin çok hızlı veya kontrolsüz bir şekilde büyümesini ve bölünmesini engelleyerek düzenler. Ayrıca hücrenin adhezyon ve göçünde, transkripsiyonel aktivasyon ve apoptozis süreçlerine de katılır. Çeşitli hücrenel olaylara katılan APC proteini hücrenin, ne kadar sıklıkta bölünme geçireceğini, doku içerisinde diğer hücrelere nasıl bağlanacağını ve doku içinde veya doku dışına hareket etmesini kontrol eder. Diğer bir görevi de hücre bölünmesi sonrasında kromozom sayılarının doğruluğunu kontrol etmektir. APC proteini yoğun görevlerini, hücre bağlanması ve sinyalinde görev alan diğer proteinlerle etkileşime girerek yapar. APC geninde mutasyon taşıyan insanların çoğunda kolorektal kanser

meydana gelmesine rağmen, poliplerin sayısı ve tümörün meydana geldiği zaman mutasyonun gendeki yerine bağlıdır.



Sekil 9. İnsan 5. kromozomu üzerinden APC geninin yerleşiminin gösterilmesi (www.ensembl.org, Erişim tarihi: 14 Nisan 2014).

APC gen ürünü hücre içi sinyal yolundaki E-kadherin'i içerir. E-kadherin hücrelerin birbiri ile etkileşimini etkiler. Kateninler, E-cadherin proteinin sitoplazmik kuyruğuna bağlanmaktadır. Alfa-katenin ve Beta-katenin APC gen ürününe bağlanmaktadır. APC proteinin değişimi hücre içi sinyal iletişiminin bozulmasına neden olur. APC fonksiyon kaybı serbest B-katenin artmasına neden olur ve hücre-hücre adhezyonunun satbilizasyonu sonucu hücresel göçü bozulacağından hücre proliferasyonunda artış meydana gelir. Dolayısıyla karsinogenez başlangıcı için ilk aşama başlamış olur.

Pek çok APC germline mutasyonu genin kodon 1598'in 5' ucunda meydana gelirken 3' ucunda nadir olarak meydana gelir. Bu mutasyonlardan bazılarının sonucunda APC proteini kısalır. Kodon 1285 ve 1465 arasındaki APC proteinin kesilmesi polipozis ile ilişkilidir. FAP'lı hastalarda çoğunda APC germline mutasyonlar olduğu gösterilmiştir. Bu mutasyonların %95'i nonsense (anlamsız) veya normal fonksiyonlu kesik protein üretimiyle sonuçlanan frameshift (çerçeve kayması) mutasyonlarıdır. En sık görülen APC germline mutasyonları kodon 200 ile 1600 arasındadır. Somatik mutasyonlar, sporadik kolorektal kanserlerinin APC allellerinin wild tipinin kaybına neden olur. Kolorektal karsinom ve adenomaların büyük çoğunluğunda meydana gelir. Genel olarak APC mutasyonları erken

tümörögenезis sırasında görölmektedir. APC'nin her iki allelerinin inaktivasyonu kolorektal kanserde çok yaygındır. Bu gendeki tüm somatik mutasyonlar birlikte değerlendirildiğinde somatik mutasyonların yaklaşık %60'dan fazlası kodon 1286 ve 1583 arasında gerçekleşmektedir. Bu bölge mutasyon küme bölgesi (Mutation Cluster Region=MCR) olarak adlandırılmış olup genin kodlayıcı sekansının %10'undan daha az kısmında yer alır. Bu bölgedeki mutasyonlar sonucunda B-katenin bağlayıcı bölgesinin aktivitesinin düzenlenmesinde bozukluklar ortaya çıkar.

APC proteini sinyal iletim yollarında bulunan integral bir proteindir ve protein ürünü çeşitli fonksiyonel kısımlar içermektedir. Bu protein hücrelerde birçok biyomoleküler ile etkileşim halindedir ve birçok bağlanma bölgesi (multidomain) içeren bir proteindir. B-katenin bağlayıcı ve B-katenin için degradasyon bölgesi bazı kısımlarındandır. Bu bölge sitoplazmik beta-katenin seviyesinin sabit tutulmasını sağlar. B-katenin, E-kadherin aktivitesi için önemli olan, doku yapısının organizasyonunda ve polaritesinde rol alır.

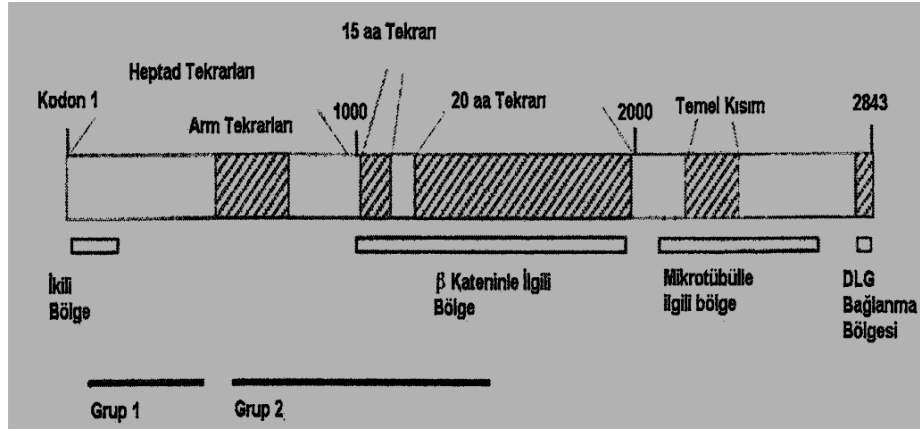
3.2.1. APC Geni Promotor Metilasyonu

APC geni 1A ve 1B olmak üzere iki promotor bölgeye sahiptir. Promotor 1B için epigenetik bir mekanizma bulgusu yok iken, 1A hipermetilasyonu hepatik kanserler, pankreatik, gastrik ve özofagus'u kapsayan insan gastrointestinal tümörlerin bir kısmında açıklığa kavuşturulmuştur. Ayrıca 1A promotor bölgesi hem kolorektal hem de adenoma kanserlerinde hipermetile olarak görölmektedir.

3.2.2. APC Geni ve Beta-kateninin WNT sinyalindeki Roller

Beta-katenin fosforlanmadığında eğer yıkılamamışsa hücrenin sitoplazması ve çekirdeğinde birikir. Bu şekilde beta-katenin birikmesi APC gen inaktivasyonundan ya da beta-kateninin kendilinden direkt mutasyolarından kaynaklı olur. Birikme wnt sinyali sonucunda gerçekleşebilir. Çekirdek içinde beta-katenin, T-hücre faktörünün üyeleriyle ve transkripsiyonel aktivatörlerden lenfoid enhancer faktörü (LEF) ailesiyle ilişkili bulunur. Beta-katenin ve TSF/LEF hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eden kompleksi oluştururlar. GSK3 β enzim aracılığı fosforilasyon, beta-katenin yıkımını önleyen APC mutasyonu, beta-katenin'in transkripsiyonel aktivasyonuna ve beta-katenin birikmesine yol açar. Sonuç olarak APC proteini işlev yapamadığı için yıkıcı kompleksin beta-katenin'i fosforilleme etkisi ortadan kalkmakta ve sinyal yolunun kontrolsüz aktivasyonu

gerçekleşmektedir. APC proteininin, Wnt/ β -katenin sinyal yolunda üstlendiği görevlerin yanı sıra *in vitro* koşullarda sitoplazmadaki hücre iskeleti elemanlarından mikrotübüllere bağlandığı ve tübülün polimerizasyonunu uyardığı gözlenmiştir. Ayrıca embriyonik kök hücrelerle yapılan deneylerde APC proteininin mitotik iplikleri ve kinetokorlar ile ilişkili olduğu ve bu proteinin fonksiyon kaybıyla sonuçlanan mutasyonlarda, kromozomların ayrılmasında da çeşitli bozukluklar meydana geldiği ifade edilmiştir (Fearnhead ve ark., 2001), (Hanson ve ark., 2005).



Şekil 10. APC gen şeması

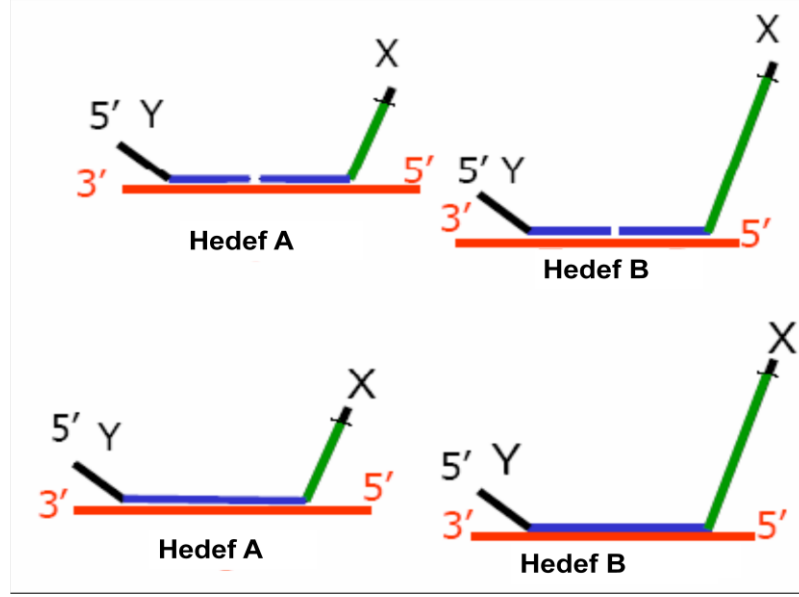
4. MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) Tekniği

Yöntem ilk olarak Schouten tarafından 2002 yılında tanımlanmıştır ve MLPA yöntemiyle birden fazla odaktaki gen delesyonları ve duplikasyonları tek bir reaksiyonla tanımlanabilmektedir (Kozlowski 2008). Çalışılan bölgedeki gen miktarlarının belirlenmesi amacını taşıyan MLPA yöntemiyle, gen bölgelerinde tek veya her iki allelde meydana gelebilecek delesyonlar ve duplikasyonlar yüzünden oluşan gen miktarlarındaki artış ve azalışlar görüntülenebilmekte ve hesaplanabilmektedir. Uygulamanın kolaylığı, yüksek duyarlılığı, güvenilirliği ve göreceli ucuzluğu bu yöntemin gen düzeyindeki tanı laboratuvarlarında hızlı bir şekilde kabul edilmesini sağlamıştır (Gonzalez 2008), (Gouas 2008).

MLPA problemleri 2 oligonükleotitten oluşmaktadır. Her bir oligonükleotit ise primer, uzunluğu belirli aralık (UBA) ve hedefe özgü dizilerden meydana gelir. Tüm MLPA problemlerinde aynı primer çifti kullanılabilir. Primerler ilgilenilen genomik DNA bölgesinde tümleyicisi bulunmayan dizilerden seçilmelidir ve genellikle 19-25 nükleotit uzunluğundadır. UBA'ların kullanılma sebebi; bu

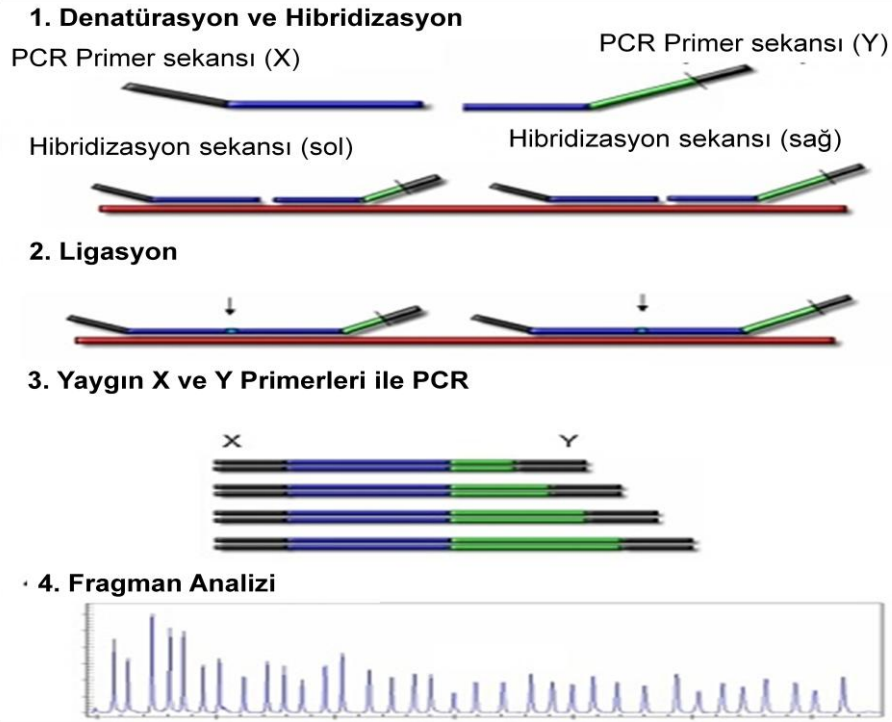
yönteminde birden fazla sayıda odağın incelenmesi için birden fazla sayıda prob kullanılacağından dolayı, bu problemlerin analiz sonucunda birbirlerine karışmasını önlemek ve dizi analizinde sinyallerin farklı yerlerde çıkış noktaları vermelerini sağlamaktır. Bu sayede her bir prob farklı nükleotit uzunluklarına sahip olur ve dolayısıyla dizi analizindeki sinyalleri farklı yerlerde çıkmaktadır. UBA'ların uzunlukları 2-400 nt arasında olmakta ve analizi yapan cihazın kapasitesine bağlı olarak daha da arttırılabilmektedir. Ayrıca aynı uzunluğa sahip problemlerin dizi analizinde sinyallerinin karışmasını önlemek amacıyla primer çiftlerinin farklı renklerde işaretlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu sayede aynı uzunluğa sahip farklı renklerde sinyaller elde edilmektedir. Hedefe özgü diziler ise ilgilenilen DNA bölgesi baz alınarak tasarlanan dizilerdir. Bu diziler ilgilenilen gen bölgesinin tümleyicisidir. İki oligonükleotitin ligasyonunu sağlamak için hedefe özgü dizi ile başlayan oligonükleotitin ucu fosfor ile işaretlenip ligasyonun sağlanması gerekmektedir. Hedefe özgü dizilerin uzunlukları bir oligonükleotitte 21-30 nt arasında, diğer oligonükleotitte ise 25-43 nt arasında olabilmektedir (Schouten 2002), (Dijk 2005).

MLPA yöntemi; hedef DNA denatürasyonu, hibritleşme, ligasyon, ligasyon sonrası hedeften ayırma (denatürasyon), amplifikasyon ve sinyallerin elde edilmesi olmak üzere 5 basamakta gerçekleşmektedir. Yöntemdeki temel yaklaşımda, problemlerdeki hedefe özgü dizilerin hedefteki varlığının belirlenmesinden sonra bu problemlerin ligasyon işlemiyle bağlanmış durumdaki kalıpları PCR yöntemiyle çoğaltılmakta ve dolayısıyla kullanılan hedef genomik DNA üzerinde herhangi bir çoğaltım işlemi uygulanmamaktadır. Öncelikle ilgilenilen hedef bölgeyi içeren çift iplikli genomik DNA'nın denatürasyon işlemi ile ipliklerinin arası açılmaktadır. Bu işlemi DNA'nın üzerine problemlerin eklenmesi ve problemlerin hibritleşmesi izlemektedir. Eğer ilgilenilen gen bölgesi ile probta bulunan hedefe özgü diziler birbirlerinin tümleyicisi ise problemlerin bu DNA bölgesine hibritleşmesi gerçekleşmektedir.



Şekil 11. MLPA problemlerinin hedef bölgelerinde hibritize olması ve ligasyonu (MRC MS MLPA 2007).

Hibritleşme işlemi sonrasında ligasyon basamağı gelmektedir. Problemlerin hedef bölgeye hibritleşmesi doğru bir şekilde gerçekleştiğinde ligasyon işlemi ile hibritlenen iki oligonükleotit birbirlerine bağlanır. Ligasyonlu problemlerin, DNA'dan denatüre edildikten sonra gen üzerinde dizisi bulunmayan primerler ile amplifikasyonu sağlanmaktadır. Ligasyon işlemi başarısız olan problemler iki primer çiftini içermeyeceğinden dolayı amplifikasyonu sağlanamaz. Kullanılan primerlerden birisi floresan işaretlidir. Amplifikasyonu gerçekleştirilen problemlerden sinyal elde edilmesi işlemi ise kapiler elektroforezde gerçekleşmektedir. Uzunlukları farklı olan problemler, kapiler elektroforezde farklı hızlarda yürürler ve farklı yerlerde sinyal vermektedirler.



Şekil 12. MLPA yöntemi ile metilasyon durumunun belirlenmesini sağlayan tekniğin basamakları (MRC MS MLPA 2007).

Hibritleşme ve ligasyon basamakları başarısızlıkla sonuçlanan problemlerin amplifikasyonu sağlanamadığından herhangi bir sinyal elde edilememektedir (Sellner 2004), (Dijk 2005). Her bir probdan elde edilen sinyallerin kontrol proba göre normalizasyonu yapılmakta ve problemlerin sinyal kararlılıklarındaki (alan/yükseklik oranı) azalış ve artışlar, ilgilenilen gen bölgesinde delesyon veya duplikasyon olup olmadığını vermekte, dolayısıyla gen miktarlarındaki azalış ve artışları göstermektedir. Örnek problemlerden elde edilen sinyallerin, kontrol grubundan elde edilen sinyallere oranı 1 ise hedef bölgede herhangi bir gen delesyonu veya duplikasyonu söz konusu değildir. Bu oran 0,5 ise hedef DNA bölgesinin bir allelinde mutasyon yani heterozigot bir durum söz konusudur. Dolayısıyla probun sadece tek bir allele hibridizasyonu gerçekleşmiştir. Oran 1,5 ise hedef DNA bölgesinin bir allelinde duplikasyon söz konusudur (Gouas 2008), (Kozlowski 2008). Kontrol pikinin gözlemlendiği yerde hiçbir pik elde edilememesi yani oranın 0 olması ilgilenilen DNA bölgesinin her iki allelinde de böyle bir hedef dizinin bulunmadığını ve homozigot delesyon olduğunu göstermektedir. Metilasyon analizleri sağlıklı kontrol grubu, çalışma grubundaki hastalarla karşılaştırılarak

değerlendirilir. Her iki gruptan bir hasta ve bir kontrol enzim kesimi sonrasında elde edilen pik değerleri karşılaştırıldığında kontrol grubunda mevcut olan ilgili gen bölgelerinin pik yüksekliğinin hasta grubundaki karşılığına bakıldığında gen bölgelerinin birebir aynı olduğunu, normalden daha yüksek pik uzunluğunun olduğunu (hipermetile) ya da daha az pik uzunluğu (hipometile) olduğunu gözlemlerken, enzim kesimi olmasına rağmen analiz edilen gen bölgesinde olmaması gereken genlerin enzim kesiminden kurtulduğunu görebiliriz. Enzim kesiminden kurtulan ve metilasyon paterninde görülen genin metillenmiş olduğunu ve metillenmeden dolayı enzimin tanıma bölgesinin bloke edildiği sonucuna varılır.

MLPA yöntemi diğer laboratuvar tanı yöntemleriyle karşılaştırıldığında daha güvenilir ve göreceli ucuz bir yaklaşımdır. MLPA çalışmalarında tüm problemler için aynı çift primerin kullanılması ve 45 veya daha fazla farklı odağın tek bir reaksiyonda incelenebilmesi yöntemin avantajlarından biridir. Yöntemin diğer bir avantajı ise çok az miktarda (20 ng) DNA ile çalışılabilmesidir (Cremonesi 2007). Gen duplikasyonları diğer anormal hemoglobin tanı yöntemleriyle belirlenemezken MLPA yöntemiyle belirlenebilmektedir. Ayrıca MLPA yönteminde çok büyük baz uzunluğuna sahip genomik DNA ile de çalışılabilir.

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. Çalışma Şekli ve Hasta Grubu

Çalışmamız retrospektif bir çalışma olup, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalından temin edilmiş kolorektal kanser tanısı alan farklı yaş, tümör derecesi ve evresinde 20 hasta birey ait tümör dokusundan izole edilmiş DNA'lar dahil edilmiştir. Hastalardan çalışmada yer alabilmeleri için onay alınmıştır ayrıca çalışmada kullanılacak hastalara ait tümör dokuların kullanılması için daha önce Cumhuriyet Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından da onaylanmıştır. Çalışmanın tamamı Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıbbi Genetik laboratuvarında yürütülmüştür. Bu yüksek lisans tezi için de 2013-2014 eğitim döneminde Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onay alınmıştır. Olgulara ait DNA'lar ile tümör baskılayıcı genlerden hücre döngüsü ve apoptozda görev alan APC genine ait promotor bölgelerinin metilasyon analizi yapılmıştır. Bununla birlikte çalışma metodunda tümör süpresör genlerden TP53, MSH6, MGMT (191 nt), MGMT (346 nt), BRCA1 ve BRCA2'nin de metilasyon profilleri analiz edilebilmiştir. Hedef gen PCR, MLPA ve sekans yöntemi ile analiz edilmiştir. Kurulan hipoteze eşdeğer sonuçlar elde edilmiş olup tümör süpresör genlerin kolorektal kanserlerdeki önemli moleküler etiyojik sebepleri, yeri ve önemi ortaya konulmuştur.

5.1.1. Hasta Seçimi

Cumhuriyet Üniversitesi Tıbbi Genetik Laboratuvarındaki mevcut DNA bankasından (-80 derecede saklanmış) kolorektal kanser tanılı bireylere ait tümör dokularından elde DNA'lar dahil edilmiştir. Çalışmada yer alan bireylerde aranan kriter daha önceden kendisi, ailesinde ve birinci derece akrabasında kanser tanısı almamış olmasıdır. DNA bankası temin edildikten sonraki tüm tez çalışması için gerçekleştirilen deneyler Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıbbi Genetik laboratuvarında yürütülmüştür. Bireylerde kolorektal kanser oluşumunun erken safhalarında bozukluğa neden olabilen tümör süpresör genlerden APC geninin CpG adasındaki metilasyon paterni analiz edilmiştir.

5.1.2. Kullanılan gereçler

Kapiller Elektrophorez Cihazı (ABI Prizm 3130)

Mikro Pipet takımı (Gilson)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

Thermal cycler (Gold 96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)

Vorteks

Deep-freeze

Buzdolabı

Santrifüj tüpleri

Eppendorf Tüpü (1,5 ml lik)

PCR tüpleri (strip)

ABI 3130 yükleme tüpleri (ABI)

ABI 3130 36, 50 cm Kapiller (ABI)

5.1.3. Kullanılan kimyasal malzemeler

Salsa MLPA ME002-C1 Tümör Supresör-2 Probe Mix (MRC Holland, HOLLANDA)

Salsa Probe Mix (MRC-Holland, HOLLANDA)

MLPA Buffer (MRC-Holland, HOLLANDA)

Ligase Buffer A (MRC-Holland, HOLLANDA)

Ligase-65-Buffer B (MRC-Holland, HOLLANDA)

Ligase-65-Buffer enzim (MRC-Holland, HOLLANDA)

Salsa PCR-primer (MRC-Holland, HOLLANDA)

Salsa polimeraz (MRC-Holland, HOLLANDA)

PCR suyu

Performans Optimize Edici Polimer 7 (POP7 TM) (ABI)

10X EDTA'lı Buffer (ABI)

Gene Scan 500 Rox Internal Size Standart (ABI)

Hi-Di Formamide (ABI)

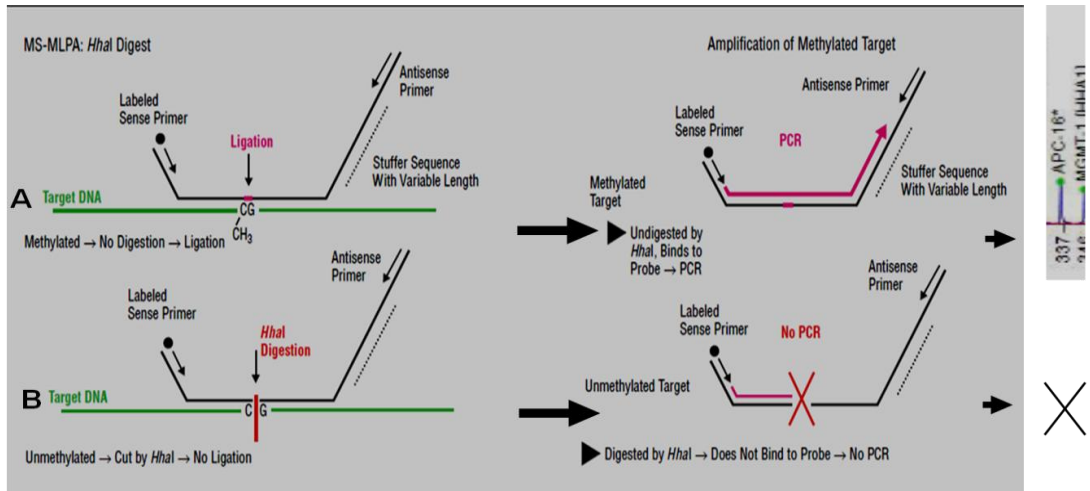
HhaI Restriksiyon enzimi (MRC-Holland, HOLLANDA)

Distile Su

5.2. YÖNTEMLER

5.2.1. Salsa MLPA Probemix ME002-C1 Tümör Supresör-2

İnsan kanserlerinin geniş bir spekturumunda CpG adalarının anormal metilasyonu tümör supresör genlerinin transkripsiyonel inaktivasyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür. CpG adası promotor bölge yakınlarında ya da insan genlerinin yaklaşık %50'sinin düzenleyici bölgesine lokalize durumdadır. ME002-C1 MS-MLPA probemix 25 farklı tümör süpresör genin promotor bölgesindeki metilasyon durumunu gösteren 27 MS-MLPA probu içerir. Bu tümör supresör genleri sıklıkla tümörlerde metilasyon tarafından sessizleştirilmiştir, fakat sağlıklı bireylerden kandan izolasyon sonucu elde edilen DNA'da metillenmemiştir. Buna ek olarak HhaI enzim kesiminden etkilenmeyen 14 referans prob içerir. Bunun yanında anormal metilasyonların saptanırken, toplamda 41 prob analiz edilen örneklerdeki kopya sayısındaki değişimler hakkında bilgi de verir. MLPA reaksiyonu için 20 ng kadar az miktarda DNA gereklidir ve çeşitli DNA örnekleri (parafin blok dokudan izole DNA örnekleri dahil) üzerinde kullanılabilir. ME002-C1 Probemix'ndeki MS-MLPA problemleri DNA örneklerinde metillenmemiş tümör süpresör genlerin promotor bölgelerinde sekansları saptar. Enzim kesimi olduğunda metillenmemiş örneklerde elde edilen sinyaller çok küçük veya hiç olmayacaktır. Bunun aksine metillenmiş örneklerde bu problemler sinyal üretecektir.



Şekil 13. Metil spesifik MS-MLPA tekniği çalışma prensibi. **A.** Hipermetile hedef gende ligasyon sonrası CpG dinükleotidde sitozin metil taşıdığı için primer sonrası *HhaI* restriksiyon enzimi özgülüğünü kaybeder ve gen bölgesi amplifiye

olabilecektir. MLPA analizinde hem kopya sayısında ve hemde metilasyon analizinde pik elde edilir. **B.** Hipometile hedef gende ligasyon sonrası CpG dinükleotidte sitozin metil taşımadığı için primer sonrası *HhaI* restriksiyon enzimi primer dizilerini (primer, prob ve kalıp DNA kompleki) kırar prob amlifikasyonu yapılamaz. MLPA analizinde hem kopya sayısı ve hemde metilasyon analizinde pik elde edilemez.

Tablo 6. SALS MS-MLPA ME002-C1 tümör supresör-2 probemix içinde mevcut olan kontrol problemleri ve incelenecek genlere ait problemlerin listesi

Uzunluk(bp)	SALSA MLPA Prob	Kromozomal pozisyon	HhaI Bölgesi
64-70-76-82	Q-fragments		
88-92-96	D-fragments		
100	X-fragment		
105	Y-fragment		
136	CREM probe 00981-L00566	10p11.21	-
140	BRCA1 probe 03296-L01269	17q21.31	+
148	BRCA2 probe 02285-L01776	13q13.1	+
154	CFTR probe 02944-L02376	7q31.2	-
161	ATM probe 03023-L23862	11q22.3	+
167	TP53 probe 18348-L23289	17p13.1	+
176	PTCH1 probe 03708-L23221	9q22.32	-
183	KLLN probe 13686-L15155	1q23.31	+
191	MGMT probe 05670-L05146	1q26.3	+
202	MLH3 probe 01245-L00793	14q24.3	-
211	PAX5 probe 03750-L23113	9p13.2	+
219	CDH13 probe 02257-L01742	16q23.3	+
232	PAH probe 02334-L21324	12q23.2	-
240	TP73 probe 16004-L23287	1p36.32	+
247	WT1 probe 18347-L23288	11p13	+
256	PMP22 probe 01462-L00927	17p12	-
265	VHL probe 03818-L03850	3p25.3	+
274	GSTP1 probe 18345-L23787	11q13.2	+
281	TSC2 probe 01832-L01397	16p13.3	-
293	CHFR probe 18344-L23785	12q24.33	+
301	ESR1 probe 02746-L02173	6q25.1	+
310	CDK6 probe 03184-L02523	7q21.2	-
319	RB1 probe 02734-L23112	13q14.2	+
328	MSH6 probe 01250-L00798	2p16.3	+
337	APC probe 01700-L01341	5q22.2	-
346	MGMT probe 18346-L23286	1q26.3	+
355	THBS1 probe 01678-L17140	15q14	+
364	CADM1 probe 03816-L17141	11q23.3	+
373	PTEN probe 03638-L17142	1q23.31	-
382	STK11 probe 06783-L17143	19p13.3	+
391	KLK3 probe 00713-L23223	19q13.33	-
398	PYCARD probe 02252-L01737	16p11.2	+
409	PAX6 probe 03749-L03209	11p13	+
418	ATM probe 02670-L02137	11q22.3	-
425	CDKN2A probe 18349-L23290	9p21.3	+
434	GATA5 probe 03752-L06199	2q13.33	+
445	IL2 probe 00627-L00183	4q27	-
453	RARB probe 04046-L02172	3p24.2	+
462	CD44 probe 04500-L02761	11p13	+
472	RB1 probe 04502-L02199	13q14.2	+
483	CASR probe 02683-L02148	3q21.1	-

5.2.2. DNA Ekstraksiyonu

Çalışmaya dahil edilen örnekler Qiagen, QiaAmp DNA Micro Kit ile DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

Qiagen, QiaAmp DNA Micro Kit ile DNA izolasyonu

1-25 mg'dan fazla doku kullanılmıştır ve mekanik olarak küçük parçalara ayırarak işleme alınmıştır.

2-2'lik eppendorf tüplere alınan doku parçaları üzerine 180µl ATL buffer ve 20µl Proteinaz K konularak vorteks yapıldı ve tamamen lizis olması için 56⁰C'de kuru blok ısıtıcıda bir gece bekletildi.

3-İnkübasyon işlemi sona erdiği doku tamamen erdiğinde üzerine 200µl AL buffer eklendi, daha sonra 15 saniye vortekslendi ve 70⁰C'de 10 dakika inkübe edildi.

4-İnkübasyon işleminden sonra tüplerin üzerine 200µl 96'luk etanol eklendi ve kısa vorteks yapıldı. Sonrasında tüm numune 2'lik filtreli (spin kolon) toplama tüpleri içersine alındı ve daha sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.

5-Santrifüj sonrası toplama tüplerinin alt kısmı atılarak üst kısımdaki filtreler yeni bir toplama tüpüne alındı üzerine 500µl AW1 buffer eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.

6-Spin kolonlar yeni toplama tüplerine alındı ve 500µl AW2 buffer eklendi, 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.

7-Spin kolonlar 1,5'luk eppendorf tüplere alınıp, toplama tüpleri atıldı ve 200µl AE buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.

5.2.3. DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi

Dokudan izole edilmiş olan DNA örneklerine MLPA reaksiyonu için DNA denatürasyonu ve MLPA problemleri ile spesifik hedef DNA'ların bir gecelik hibridizasyonu aşamaları uygulandı.

5.2.3.1. DNA Denatürasyonu ve SALSA ME002-C1 Probe Miks ile Hibridizasyonu

Mevcut DNA konsantrasyonlarına göre farklı şekillerde TE Buffer ile dilue edildi; dilüsyon 5µl (20-250 ng) DNA ve 20µl TE ile gerçekleştirildi ve bu karışımdan alınan 5µl DNA örnekleri 200µl lik PCR strip tüplerine aktarıldı. 98⁰C'de 5 dakika Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA'nın denatürasyonu

gerçekleştirildi. Daha sonra örnekler 25⁰C'ye soğutuldu, 25⁰C'deki DNA örneğinin üzerine 1,5µl SALSA Probe Mix (ME002-C1) ve 1,5µl MLPA Buffer hazırlanan hibridizasyon mix'ten 3µl ilave edilip pipetaj ile homojenize edildi. PCR strip tüplerinde buharlaşmayı kontrol etmek için çalışma grubunun yanına başka bir PCR tüpünde 20µl steril su konuldu. Böylece 17 saat sonra hibridizasyon sona erdiğinde buharlaşma olup olmadığı kontrol edildi. Daha sonra 95⁰C'de 1 dk. inkübe edilip örnekler 60⁰C'de 17 saat hibridizasyona bırakıldı.

5.2.3.2. Ligasyon ve Enzim Kesim Reaksiyonu

Hibridizasyon sonrası reaksiyon iki ayrı tüpe bölünerek hem standart MLPA reaksiyonu hem de metilasyona spesifik yöntem uygulandı. Hibridizasyon ürününe 3µl Ligaz-Buffer A ve 10µl su ilave edildi ve pipetajla karıştırıldı. Bu karışımın 10µl'si yeni hazırlanan PCR tüplerine aynı olgu numaralarına dikkat edilerek aktarılıp ikinci bir seri oluşturuldu. Tüpler en az 1 dakika 48⁰C'de bekletildi. Her iki seriye aynı anda muamele yapılmış olup, ilk seri ilgili genin kopya sayısı değişimini analiz etmek için standart MLPA reaksiyonu gerçekleştirmektedir bu yüzden hibridizasyon ürününe 48⁰C'de Ligaz 65 karışımından 10µl ilave edildi. İkinci seri metilasyon paternini analiz etmek için enzim kesimi gerçekleştirilmektedir; Ligaz-Kesim Karışımından 10µl ilave edildi ve 48⁰C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 98⁰C'de 5 dk. bekletilerek ligaz inaktivasyonu sağlandı.

Ligaz 65 Karışımı: Her örnek için 1,5µl Ligase 65 Buffer B, 8,25µl su, 0,25µl Ligase 65 enziminin karıştırılmasıyla hazırlandı.

Ligaz-Kesim Karışımı: Her örnek için 1,5µl Ligase 65 Buffer B, 7,75µl su, 0,25µl Ligase 65 ve 0,5µl Hha1 enziminin (10 ünite/µl) karıştırılmasıyla hazırlandı.

5'-G C G[^]C-3'

3'-C[^]G C G-5'

Şekil 14. HhaI enzimi metilasyon duyarlı çalışma mekanizmasına ilgili genin tanıma bölgesinde metilasyon varlığında enzim kesim bölgesi. Kesim sonrası yapışkan uç (stiky end) fragmanlar oluşmaktadır.

5.2.3.3. PCR

Hem standart MLPA reaksiyonu hem de metilasyona spesifik MLPA işlemlerinin amplifikasyonları yapıp kapiller jel elektroforez cihazında değerlendirilebilmek için aşağıdaki protokollerle PCR işlemine tabi tutuldu.

- 1µl SALSA PCR primer,
- 3,75µl distile su,
- 0,25µl SALSA Polimeraz ile hazırlanan mix oda sıcaklığında PCR ürününe (Ligasyon ve enzim kesim reaksiyonu ürünü) 5µl konularak PCR başlatıldı.

-PCR koşulları:

Denatürasyon 30 sn 95 ⁰ C	} 35 döngü
Annealing 30 sn 60 ⁰ C	
Ekstansiyon 60 sn 72 ⁰ C	
Final Ekstansiyon 20 dk 72 ⁰ C	

5.2.3.4. ABI 3130 cihazına yükleme

Amplifikasyonu gerçekleşen örnekler fragment analizi için aşağıdaki protokol ile kapiller jel elektroforez cihazına yüklendi.

- PCR bitiminde elde edilen ürünlerden 0,7µl alınarak ABI 3130 cihazı yükleme tüplerine aktarıldı.
- Daha sonra üzerlerine:
- 0.2µl internal size standart (Liz 500)
- 9µl deiyonize formamid konularak pipetajla homojenize edildikten sonra karışımdan 9,2µl ABI 3130 cihazı yükleme tüplerindeki PCR ürünlerine ilave edilerek iyice pipetaj ile homojenize edildi.
- Örnekler 86⁰C de 3 dk Thermal Cycler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlandı. Devamında örnekler yaklaşık 20 saniye bekletilmek üzere buz üzerine alındı.
- ABI 3130 cihazında; 1,6kV de 15 saniye injeksiyon zamanı, 60⁰C ve 15kV de 30 dakika yürütme zamanı, filitre şartları sağlandı.
- Daha sonrasında örnekler ABI 3130 cihazına yüklenilerek, Gene Mapper programında okutulmaya başlandı.
- Her örneğe ait pik görüntüleri elde edildi.

5.2.3.5. Değerlendirme

MLPA ürünlerindeki problemlerin elde edilen boyut ve pik alanları Coffalyser MLPA analiz programlarıyla değerlendirildi. MS-MLPA yönteminde hasta değerlendirme şekli diğer MLPA problemlerine göre farklılıklar göstermektedir. Normal MLPA çalışmalarının değerlendirmesinde, hastalara ait DNA'lardan elde edilen pik alanlarının diğer sağlıklı kontrollere ait pik alanlarıyla karşılaştırılması büyük önem taşır. MS-MLPA'da ise pik alan ve büyüklüğü değil, pikin varlığı ya da yokluğunun belirlenmesi yeterli olmaktadır. MS-MLPA çalışmasında örnekler iki gruba ayrıldı. Bir grupta normal MLPA reaksiyonu gerçekleştirilirken diğerinde metilasyona duyarlı enzim reaksiyonu gerçekleştirildi. Çalışmanın sonucunda bir örneğe ait iki ayrı reaksiyondan elde edilen ürünlere ait pik görüntüsü elde edildi.

Çalışmamızda metilasyon profili değerlendirilmesi hedeflendiği için enzim ile kesimi yapılmış örnekler için pikler analiz edildi. Ancak yöntemin kendi içinde oluşturduğu internal kontrol basamağı olarak ilk etapta enzim ile kesime tabi tutulmamış örnekler için pikler incelenerek, prob bölgelerinin varlığı kontrol edildi. Bu kontrol sonrasında herhangi bir pik kaybı olmayan örnekler ile ikinci aşamaya geçildi.

Değerlendirmenin ikinci aşamasında enzim kesimine tabi tutulmuş örneklerden elde edilen pik görüntüleri incelendi. Kullanılan kit içerisinde kontrol prob bölgeleri bulunmaktadır. Normal koşullarda sadece kontrol bölgelerine ilişkin pikler elde edilir. Prob bölgelerinde metilasyona spesifik endonükleazlara özgü tanıma bölgeleri bulunmadığından enzim ile kesim olmamakta, ligasyona bağlı olarak pikler elde edilmektedir. Bu kontrol bölgelerine ait piklerden başka pik olup olmadığı Genemapper programı ile değerlendirilir. Çalışmamızda kullandığımız metilasyon spesifik bir restriksiyon enzimi olan HhaI, tanıdığı bölgelerin metile olmaması durumunda diziyi keserek, ligasyon oluşmasını engeller. Böylece bu prob bölgesi PCR ile çoğaltılamaz ve pik elde edilemez. Eğer incelenen prob bölgesi metillenmiş ise HhaI enzimi bu prob dizisini kesemez. Kesilmeyen prob bölgesinde ligasyon işlemi gerçekleşir ve ligasyon ile birleştirilen problemler PCR ile amplifiye olur. Amplifiye olan problemlerden da pik elde edilir. Sonuç olarak HhaI enzimi ile kesim işlemine tabi tutulan örnekler incelendiğinde, HhaI enzim tanıma bölgesi içermeyen kontrol pikleri ve tanıma bölgesi olmayan gen bölgeleri dışında saptanan

ekstra pikler, bu proba spesifik gen bölgesinin metile olduğunu ifade edildi. Bu kriterler doğrultusunda çalışmamızda örnekler Genemapper programı ile tek tek incelenerek metile olan prob bölgeleri tespit edildi. Ancak bizim çalışmamızda birincil olarak analiz etmeyi hedeflediğimiz TS APC genine için HhaI enziminin tanıma bölgesi olmadığı ve dolayısıyla her çalışmada enzim kesiminden kurtularak pik vermiştir ve %100 metile olarak değerlendirilmiştir. APC geni dışında 27 tümör supresör gen bölgesi HhaI enzimi tarafından tanınmaktadır. Çalışma sonucunda enzimin tanıma bölgesinde bulunan pek çok gen bölgesinde metilasyon saptansa da tümör oluşum mekanizmalarında inaktivasyonu en sık karşımıza çıkan TP53, MSH6, MGMT (191 nt), MGMT (346 nt), BRCA1 ve BRCA2 genleri değerlendirmeye alınmıştır. Bu hedef ile Tp53 geni %60 (12/20), MSH6 geni %60 (12/20), MGMT (191 nt) % 10 (2/20), MGMT (346 nt) %10 (2/20) oranında metilasyon saptanırken BRCA1 ve BRCA2 genlerinde metilasyon saptanmamıştır.

6. BULGULAR

Çalışmamızda 45-87 yaşları arasında 13'ü erkek, 7'si kadın 20 kolorektal kanser tanısı almış, farklı tümör derecesi ve evresindeki bireyler ait tümör dokularından izole DNA örnekleri ve kolon kanser tanısı almayan normal 1 bireye ait periferik kandan izole DNA örneği yer almaktadır. Çalışma olgularında primer hedef epigenetik analiz yapmaktır. Bu yüksek lisans tez projesinin tamamı MS-MLPA tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma metodunda SALSA MS-MLPA ME002-C1 probemix'inde HhaI restriksiyon endonükleaz enzimin tanıma bölgesi olmayan; APC, CREM, CFTR, PTCH1, MLH3, PAH, PMP22, TSC2, CDK6, PTEN, KLK3, ATM, IL2 ve CASR 14 gen bölgesi mevcut olup, çalışmamızda öncelikli olarak araştırmayı hedeflediğimiz tümör supresör APC geni için HhaI enziminin tanıma bölgesi olmadığı için her çalışmada enzim kesiminden kurtulmuştur. Dolayısıyla CpG adasını içeren promotor bölge metilasyonunu analizinde %100 metilli saptanmıştır. Ancak diğer incelediğimiz tümör supresör Tp53, MGMT (191 nt), MGMT (346 nt), BRCA1, BRCA2 ve MSH6 genleri için tanıma bölgesi olup metilasyon paternleri incelenmiştir.

Tablo 7. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik ve Klinik Özellikleri

Klinik Karakter		KRK Hastaları (n=20)	
Ortalama Yaş		63.22±30.41(45-87)	
Cinsiyet n/%			
Erkek		13/65,0	
Kadın		7/35,0	
Materyal Tipi n/%		Periferik kan-EDTA, 20/100	
Kanser Tipi n/%	Rektal	4/20,0	
	Kolonial	16/80,0	
Tümör Tipi n/%		Adenokarsinoma	16/80,0
		Musinöz	3/15,0
		TubuvillözAdenom	1/5,0
Tümör Farklılaşma Tipi n/%		İleri	3/15,0
		Orta	7/35,0
		Düşük	1/5,0
		Non-Diferansiye	9/45,0
Derece n/%		1. Derece	2/10,0
		2. Derece	13/65,0
		3. Derece	2/10,0
		İleri Derece	2/10,0
		Bilinmiyor	1/5,0

DNA metilasyonunu bakteriyi restriksiyon ajanlarına karşı koruduğunu ortaya çıkarmıştır. Bakteri, kendi DNA'sını kendi endonükleazlarından korumak için metiller. HhaI restriksiyon endonükleaz (RE) enzimi, fotosentetik siyanobakterilerin bir türü olan *Microcystis aeruginosa* bakterisinden elde edilmiş metilaz modifikasyon enzimidir. Tümör supresör genlerin CpG adacıkları Sitozin ve Guanin bazından zengin olan promotör bölgede metilasyona duyarlılığı bilinen HhaI RE enzimi insan genomik DNA'sı ile muamele edildiğinde ilgili gen bölgesinde metilasyon varsa bu alanlar tıpkı bakterilerdeki mekanizmaya benzer şekilde korunacaktır ve dolayısıyla metillenmemenin olduğu korunan bölgeler enzim

kesiminden kurtulmuş olurlar. MS-MLPA tekniği ile yapılan çalışma verileri Coffalaysen programında analiz edilmiş olup, enzim kesim reaksiyon sonuçları değerlendirilmiştir. Metilasyonun gerçekleştiği tümör supresör gen bölgelerinde pik elde edilen bölgelerin enzim kesim (cut reaksiyonu)'inden korunduğunu bu yüzden pik görüldüğü sonucuna ulaşıldı. Yapılan araştırmada elde edilen metilasyon analiz sonuçlarında tümör supresör APC geni %100 (20/ 20), Tp53 geni %60 (12/20), MSH6 geni %60 (12/20), MGMT (191 nt) %10 (2/20), MGMT (346 nt) %10 (2/20) oranında metilasyon saptanmıştır. Tümör supresör BRCA1 ve BRCA2 genleri aktif olup metilasyon saptanmamıştır dolayısıyla her iki gen de %0 metilasyon bulunmuştur.

Tablo 8. Kolorektal Kanser (KRK) tanılı olgulara ait her bir hedef TS APC, TP53, MGMT (191 nt), MGMT (346 nt), MSH6, BRCA1 ve BRCA2 genlerinde tüm hastalarda saptanan metilasyona bağlı tümör supresör inaktivasyonun oransal dağılımı gösterilmektedir.

TS GENLER	NÜKLEOTİD UZUNLUĞU (nt)	KROMOZOMAL BÖLGE	İNAKTİVASYON ORANI n/%
APC	337 nt	5q22.2	20/100**
TP53	167 nt	17p13.1	12/60*
MGMT	191 nt	10q26.3	2/10
MGMT	346 nt	10q26.3	2/10
MSH6	328 nt	2p16.3	12/60*
BRCA1	140 nt	17q21.31	0/0
BRCA2	148 nt	13q13.1	0/0

*: Anlamlı; **: Anlamlı, fakat kullanılan primerlerde enzim tanıma bölgesi olmaması nedeniyle bu gene ait sonuçlar bisülfid veya eşdeğer epigenetik analiz teknikleri ile konfirme edilmelidir.

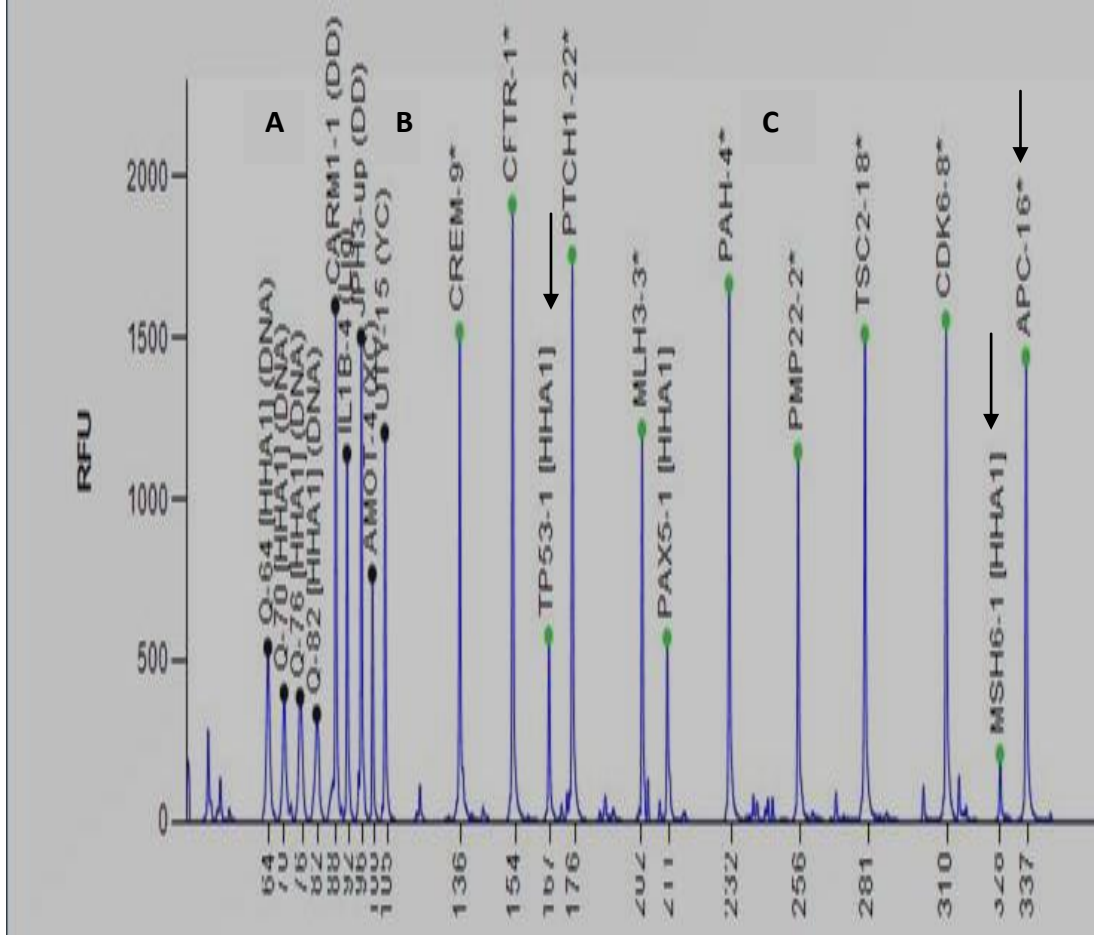
Tablo 9. Kolorektal kanser (KRK) tanısı alan her bir olguya ait hedef TS APC, TP53, MGMT (191 nt), MGMT (346 nt), MSH6, BRCA1 ve BRCA2 genlerin aktif/inaktif durumları gösterilmektedir. Araştırma sonuçlarına göre elde edilen hedef tümör supressör (TS) gen epigenetik profilleri. Tümör dokularından elde edilen yüksek moleküler ağırlıklı genomik DNA örnekleri MS-MLPA tekniği ile hedef TS genler metillenme derecelerine göre kimliklendirilmiştir.

Olgu	APC (337nt)	TP53 (167nt)	MGMT (191 nt)	MGMT (346 nt)	MSH6 (328nt)	BRCA1 (140 nt)	BRCA2 (148 nt)
1	İnaktif	Aktif	İnaktif	İnaktif	İnaktif	Aktif	Aktif
2	İnaktif	İnaktif	Aktif	Aktif	İnaktif	Aktif	Aktif
3	İnaktif	İnaktif	Aktif	Aktif	İnaktif	Aktif	Aktif
4	İnaktif	İnaktif	Aktif	Aktif	İnaktif	Aktif	Aktif
5	İnaktif	İnaktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif
6	İnaktif	Aktif	Aktif	Aktif	İnaktif	Aktif	Aktif
7	İnaktif	İnaktif	Aktif	Aktif	İnaktif	Aktif	Aktif
8	İnaktif	İnaktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif
9	İnaktif	İnaktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif
10	İnaktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif
11	İnaktif	İnaktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif
12	İnaktif	İnaktif	Aktif	Aktif	İnaktif	Aktif	Aktif
13	İnaktif	Aktif	Aktif	Aktif	İnaktif	Aktif	Aktif
14	İnaktif	İnaktif	Aktif	Aktif	İnaktif	Aktif	Aktif
15	İnaktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif
16	İnaktif	İnaktif	Aktif	Aktif	İnaktif	Aktif	Aktif
17	İnaktif	Aktif	Aktif	Aktif	İnaktif	Aktif	Aktif
18	İnaktif	Aktif	Aktif	Aktif	İnaktif	Aktif	Aktif
19	İnaktif	İnaktif	İnaktif	İnaktif	Aktif	Aktif	Aktif
20	İnaktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif	Aktif

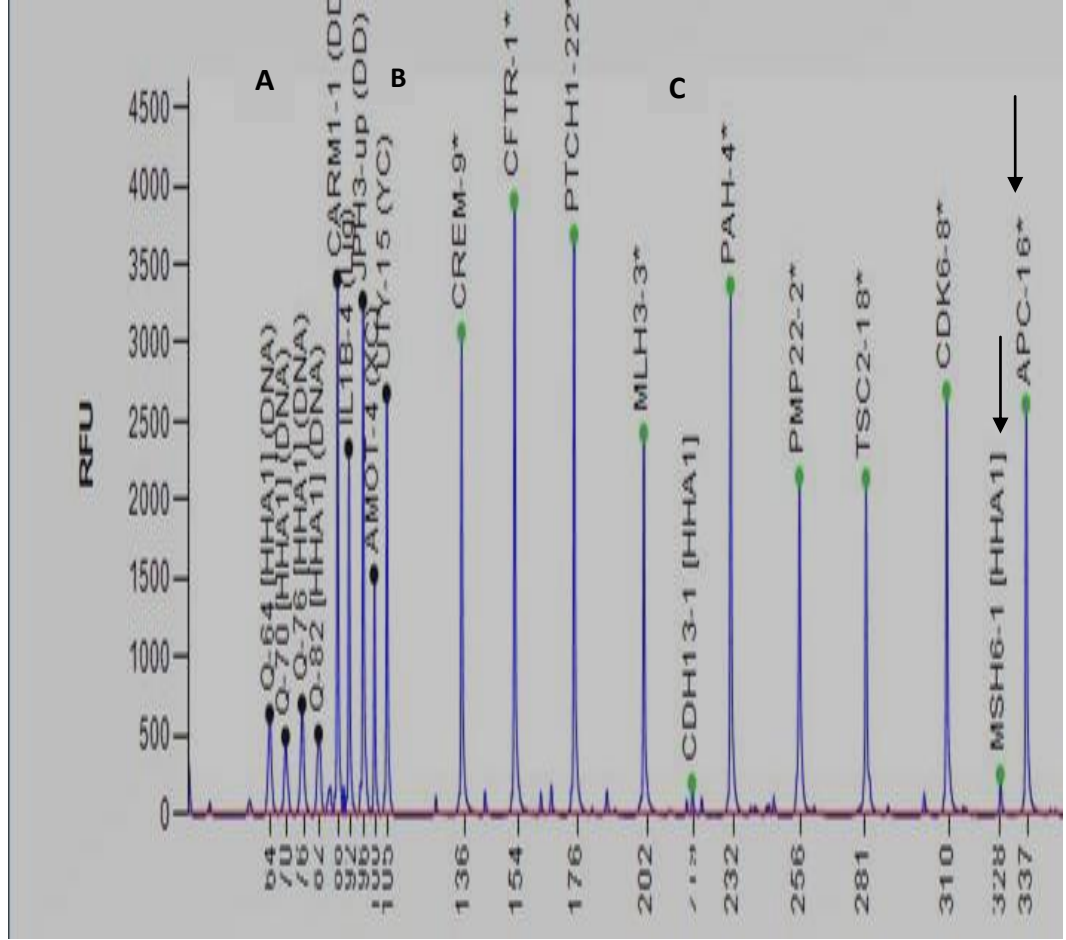
*: Tümör dokularında inaktif (promotor bölge hipermetilasyonu) tümör supresör genler koyu(bold) olarak gösterilmiştir.

Tüm çalışmalar coffalyser programında gerçekleştirilmiştir. Program DNA fragment analizi ve örnek numunelerin komperatif analizi olmak üzere iki aşamada MLPA analizi yapabilmektedir. Programın kolaylığı bir hastaya ait kopya sayısı analizi ve metilasyon analizini aynı tabloda incelenebilmesi, dahası iki veya daha fazla hastaya ait verileri aynı karede değerlendirebilme imkanı sunmasıdır. Analizi yapılan numuneye ait fragmet boyu, pik alanı ve oransal grafik görüntülerine

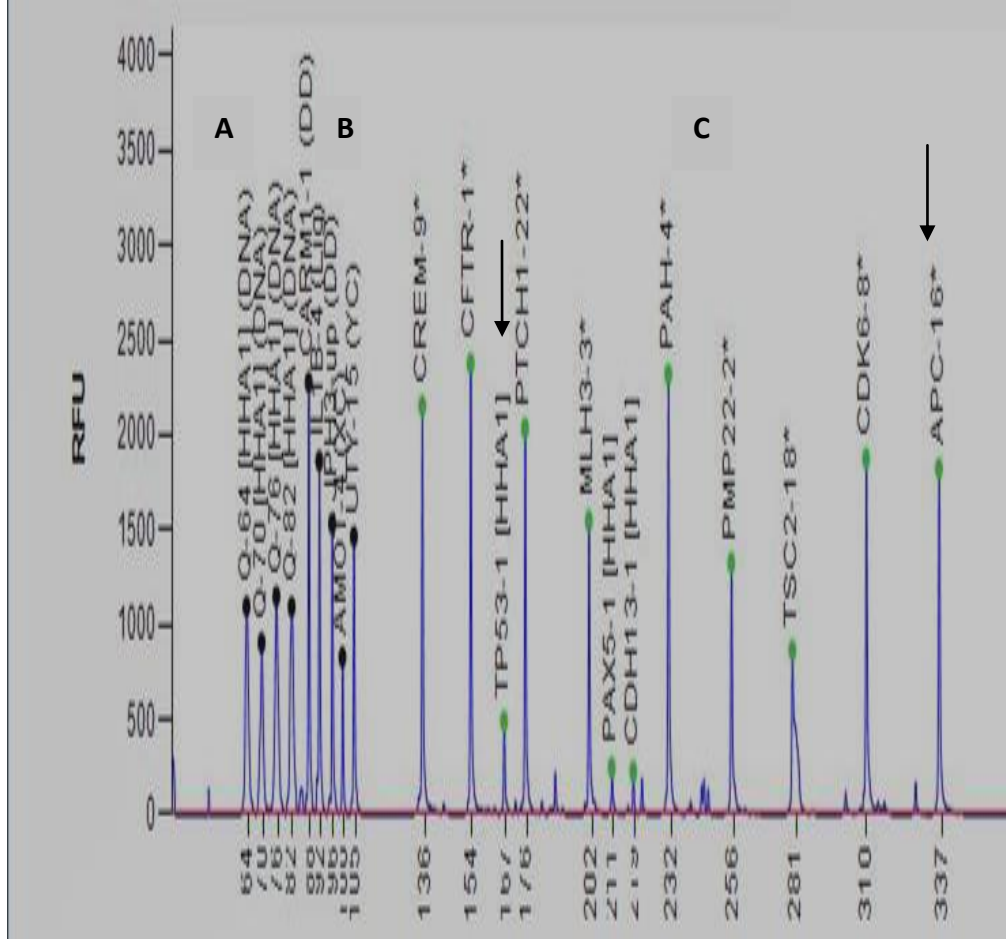
ulaşlabilmektedir.



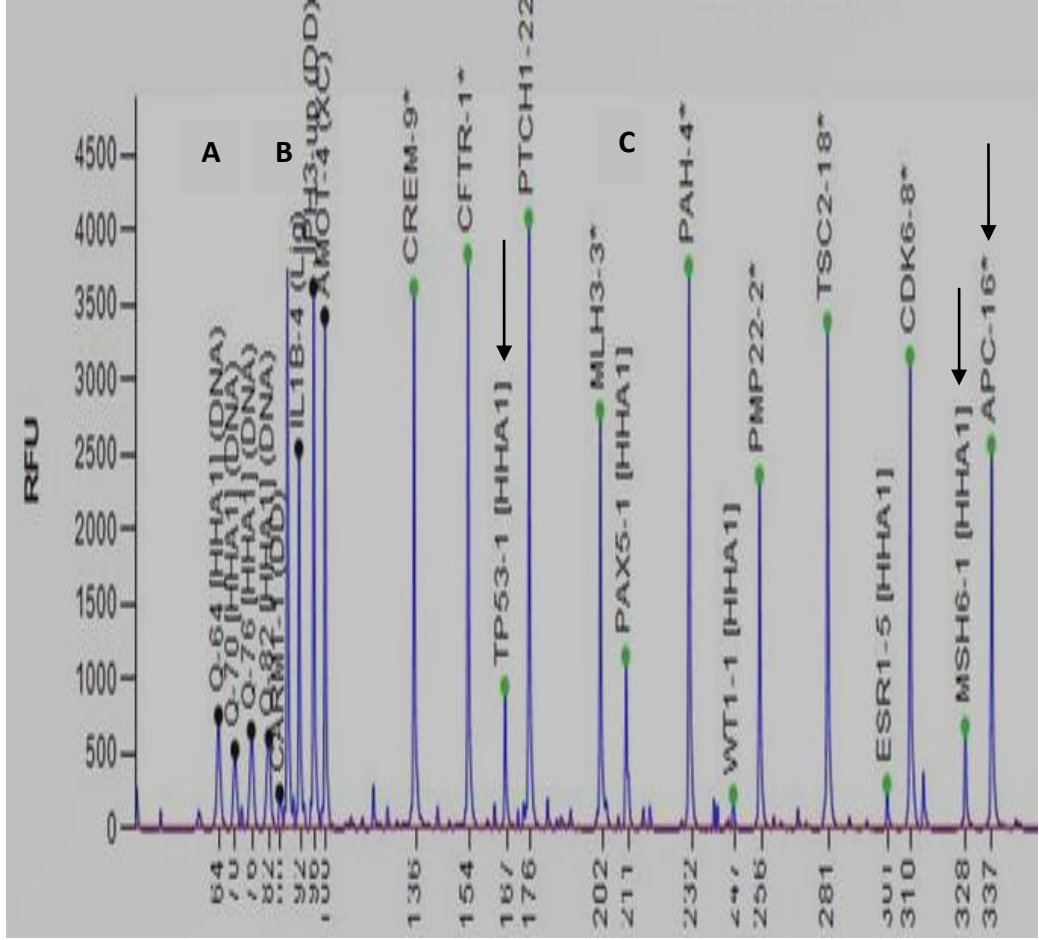
Şekil 15. Araştırmadaki hasta bireye ait tümör dokusundan genomik DNA'nın hedef gen analiz profilleri değerlendirilmektedir. Dört adet PCR kontrol (A), beş adet cinsiyet kontrol (B), genleri aktif durumda olan erkek (46, XY) birey. Hedef 37 adet tümör supresör ve housekeeping genlerinden TP53, MSH6 ve APC inaktif (hipermetile) olduğu MS-MLPA tekniği ile ortaya konmuştur (C).



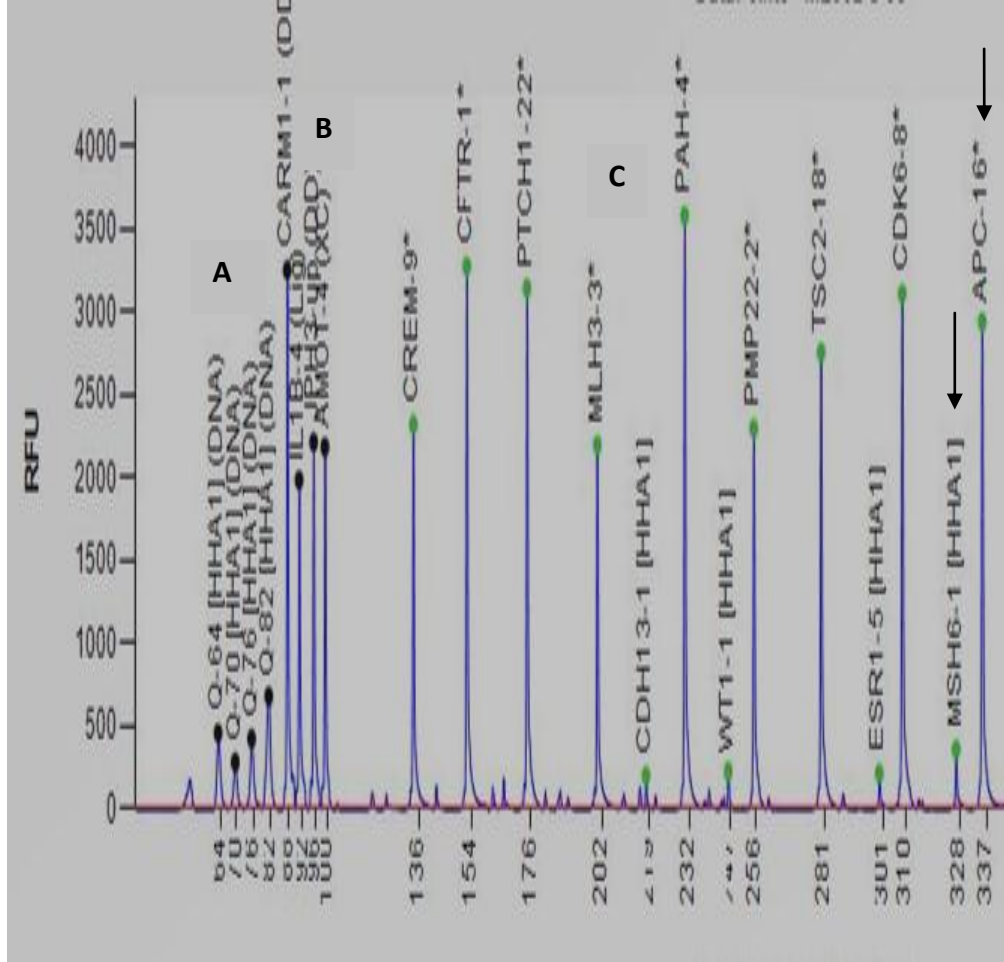
Şekil 16. Araştırmadaki hasta bireye ait tümör dokusundan genomik DNA'nın hedef gen analiz profilleri değerlendirilmektedir. Dört adet PCR kontrol (A), beş adet cinsiyet kontrol (B), genleri aktif durumda olan erkek (46, XY) birey. Hedef 37 adet tümör supresör ve housekeeping genlerinden MSH6 ve APC inaktif (hipermetile) olduğu MS-MLPA tekniği ile ortaya konmuştur (C).



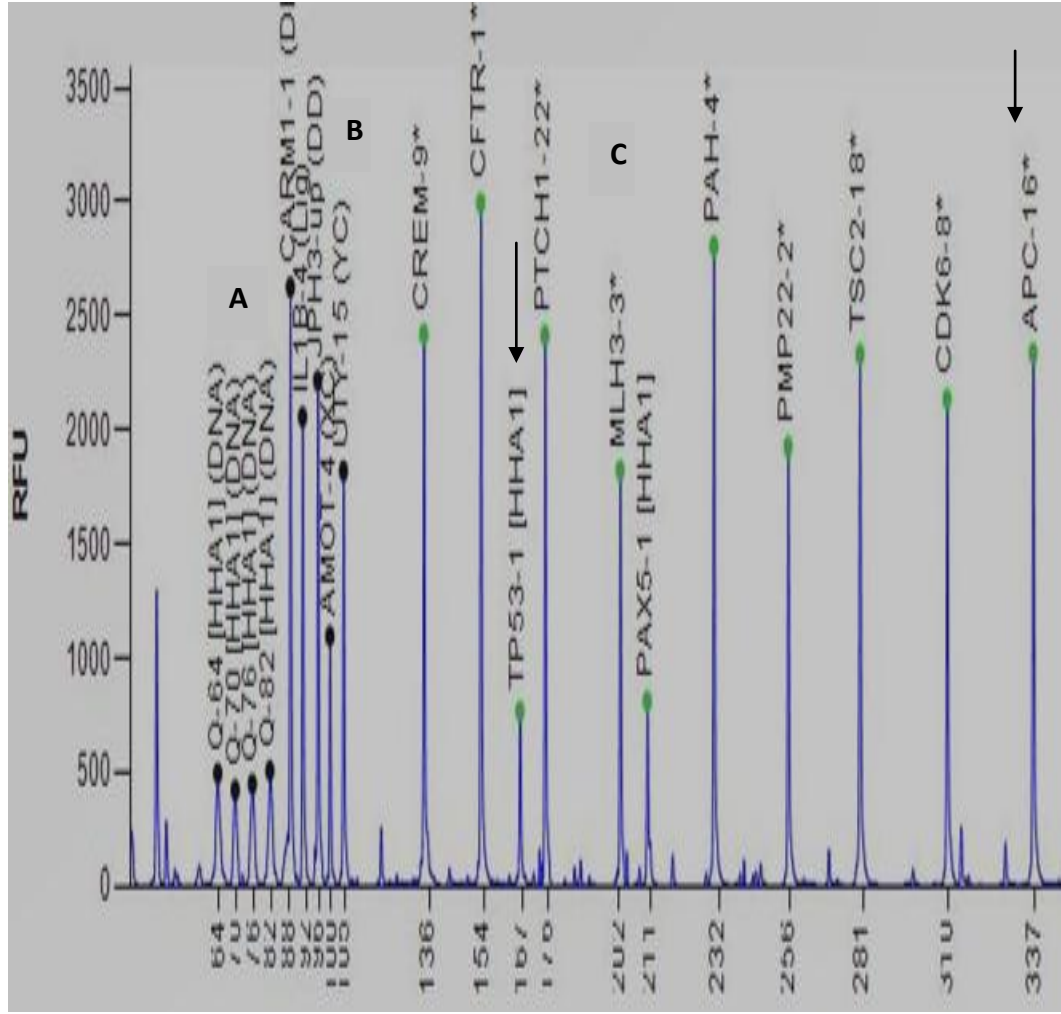
Şekil 17. Araştırmadaki hasta bireye ait tümör dokusundan genomik DNA'nın hedef gen analiz profilleri değerlendirilmektedir. Dört adet PCR kontrol (**A**), beş adet cinsiyet kontrol (**B**), genleri aktif durumda olan erkek (46, XY) birey. Hedef 37 adet tümör supresör ve housekeeping genlerinden TP53 ve APC inaktif (hipermetile) olduğu MS-MLPA tekniği ile ortaya konmuştur (**C**).



Şekil 18. Araştırmadaki hasta bireye ait tümör dokusundan genomik DNA'nın hedef gen analiz profilleri değerlendirilmektedir. Dört adet PCR kontrol (A), beş adet cinsiyet kontrol (B), genleri aktif durumda olan erkek (46, XY) birey. Hedef 37 adet tümör supresör ve housekeeping genlerinden TP53, MSH6 ve APC inaktif (hipermetile) olduğu MS-MLPA tekniği ile ortaya konmuştur (C).



Şekil 19. Araştırmadaki hasta bireye ait tümör dokusundan genomik DNA'nın hedef gen analiz profilleri değerlendirilmektedir. Dört adet PCR kontrol (A), beş adet cinsiyet kontrol (B), genleri aktif durumda olan erkek (46, XY) birey. Hedef 37 adet tümör supresör ve housekeeping genlerinden MSH6 ve APC inaktif (hipermetile) olduğu MS-MLPA tekniği ile ortaya konmuştur (C).



Şekil 20. Araştırmadaki hasta bireye ait tümör dokusundan genomik DNA'nın hedef gen analiz profilleri değerlendirilmektedir. Dört adet PCR kontrol (A), beş adet cinsiyet kontrol (B), genleri aktif durumda olan erkek (46, XY) birey. Hedef 37 adet tümör supresör ve housekeeping genlerinden TP53 ve APC inaktif (hipermetile) olduğu MS-MLPA tekniği ile ortaya konmuştur (C).

7. TARTIŞMA

Yakın gemişı olmasına rağmen tümör baskılayıcı genlerdeki epigenetik değişimlerin incelendiği pek çok çalışma yapılmıştır. Üzerinde en çok çalışma yapılan Epigenetik değişimler içerisinde en önemli çalışma sahası DNA metilasyonu olmuştur. Araştırmacıların geçmişte daha çok gen düzeyindeki mutasyonlar ve sonuçlarıyla ilgilenirken, son yıllarda metilasyonun kanser genetiğindeki rolünün anlaşılmasından sonra farklı kanser genlerinin metilasyon profilleri ve sonuçları üzerine yoğunlaşılmıştır. Genomda metilasyon profillerindeki değişimleri incelerken birçok teknik kullanmışlardır. Kolorektal kanser genetik mekanizması en iyi anlaşılmiş kanser türüdür. 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 oldukça önemlidir.

Kolorektal karsinogenezde genomik instabilitenin tipine bağlı olarak iki farklı moleküler gelişim modeli tanımlanmıştır; birincisi kromozomal instabilite arayolu ve ikincisi DNA mikrosatellit instabilite arayoludur. Kolorektal karsinogenezdeki bu gelişim modellerinden ilkinde çeşitli onkogen ve tümör süpresör genlerde görülen seri mutasyonların ardı ardına birikimi sonucu kromozomal instabilite ortaya çıkmaktadır. Bu ara yolda, moleküler değişiklere tanımlanabilen bir dizi morfolojik değişiklik eşlik etmekte ve lezyonların progresyonu sonucu kolorektal karsinoma gelişmektedir. En erken lezyon lokalize epitelyal proliferasyonlar şeklindedir. Bu süreci takiben küçük adenoma oluşumu ve daha sonra bunların büyümesiyle displastik değişikliklerin ortaya çıkması ve sonunda da invaziv kanserin gelişimi izlemektedir. Bu model ilk kez 1990 yılında Fearon and Vogelstein tarafından adenoma-karsinoma sekansı olarak tanımlanmıştır. Bu dizyana göre, APC tümör supresör gende görülen mutasyon adenom gelişimi boyunca erken dönemde yer almakta, daha sonra adenomatöz evre boyunca k-ras mutasyonu, maligniteye geçişte ise p53 mutasyonu ve kromozom 18q delesyonundan söz edilmektedir. APC'deki germline mutasyonlar Familyal Adenomatöz Polipozis sendromuna yol açarken, sporadik kolorektal karsinomların %80'inde APC'de somatik mutasyon saptanmıştır. Buradan çıkarılabilecek muhtemel sonuçlardan birisi APC genin kolorektal kanserlerin erken evrelerde öncü lezyonda yer alabileceği veya kanser

progresyonunu ilerletici etkiye sahip olabileceğidir. Kansere yol açan yolların bozulmaları genelde ilgili genin promotörünün de novo metilasyonu ilişkilendirilmiştir. Epigenetik susturulma Knudson hipotezini karşılayan üçüncü yolak olarak kabul edilmiştir. DNA metilasyonun çoğunluğu memelilerde 5'-CPG-3' dinükleotidleri içerir fakat diğer metilasyon kalıpları vardır. Normalde bütün 5'-CPG-3' dinükleotidlerinin %80 civarı memeli genomlarında metillenmiş olduğu bulunmuş, öyleki metile olmayanların %20'si promotör bölgelerde ya da genin ilk ekzonunda yer almaktadır. Biyokimyasal olarak tümör baskılayıcı genlerin metilasyonu, delesyonlara karşı alternatif bir mekanizma oluşturduğu düşünülmektedir. Günümüzde tümör baskılayıcı genlerin heterozigosite kayıplarında diğer alelin en azından metilasyona uğradığı düşünülmektedir. Metilasyon; CpG dinükleotitinde, sitozin rezidülerinin, metil grubu ile birleşmesi ile gerçekleşir ve tümör baskılayıcı genlerin ve hatta bir kromozomun fonksiyon kaybı ile sonuçlanır. Biz öncelikle promotör bölgelerdeki CpG adalarındaki CpG adalarındaki CpG adalarıyla ilgilendik çünkü metillendikleri zaman gen sürekli sessiz hale gelir ve bu sessizlik mitoz bölünmeler boyunca aktarılır. Bu sebeple CpG adalarının metilasyonu epigenetik bir anlamını temsil ettiği düşünülür. CpG adalarının öncelikli olarak, ifade olan genlerin 5' bölgesinde buldukları gözlenmiştir ve insan promotörlerinin %60'ından fazlası bu CpG adalarını içermektedir. Bu yüksek lisans tezinde kolorektal kanserde epigenetik mekanizmaların rolü ve tümör supresör APC gen fonksiyon analizi değerlendirilmiştir. DNA metilasyonu DNA metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilen enzimatik bir modifikasyondur. Eklenmiş olan metil grubu baz eşleşmesinin kendisini etkilemez fakat metil gruplarının dışarı doğru çıkıntı yapması DNA-protein etkileşimlerini etkileyebilir. Ökaryotlarda DNA metiltransferazların iki farklı tipi tanımlanmıştır; de nova metiltransferazlar, Dnmt3a ve Dnmt3b gibi, metiltransferazlar, Dnmt1 gibi, metilasyon alanlarının replikasyonu ile oluşan yarı metillenmiş DNA'yı metillerler. Bakım metilasyonu kalıp DNA iplikçığının varolan metilasyon paternini yeniye sentezlenmiş olana kopyalar. Bu nedenle DNA metilasyonu kalıtlanabilir ve epigenetik bir işaret olarak nesiller boyunca mitotik ve mayotik hücre bölünmeleriyle transfer edilir. Tümör baskılayıcı APC geninin (Aoki ve Taketo, 2007) promotör bölgesinin metilasyonu, gen ürününün baskılanmasına neden olup hücre döngüsünde işlev görmesini

engelleyip böylece hücrenin kanser oluşumuna doğru yol almasını sağladığı düşünülmektedir. Tümör supresör gen promotor bölge metilasyon analizleri sonucunda APC geni %100 (20/ 20), Tp53 geni %60 (12/20), MSH6 geni %60 (12/20), MGMT (191 nt) %10 (2/20), MGMT (346 nt) %10 (2/20) oranında metilasyon saptanmıştır. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde metilasyon saptanmamıştır.

Metilasyon analizi çalışmaları için en çok kullanılmış olan tekniklerden birisi Metil spesifik PCR (MSP)'dir. Bu yöntemde temel işlem, elde edilen DNA'nın bisüfit modifikasyonu, sitozinlerinin urasile çevrilmesidir. Metile olan sitozin ise urasile dönüşmeyecektir. Bu reaksiyondan yararlanılarak geliştirilen yöntemde, PCR'dan sonra yapılan DNA sekans analizinde metillenmemiş sitozinler timin olarak okunur, metillenmiş olanlar ise sitozin olarak kalırlar, böylece metillenmiş ve metillenmemiş DNA saptanabilir. Ancak bu yöntemin uzun zaman aldığı ve zahmetli olduğu için artık çok tercih edilmemektedir. Diğer bir metilasyon tarama yöntemi de RealTime PCR yöntemidir. Bu yöntemde de MSP ile aynı modifikasyon basamakları gerçekleştirilir. Dolayısıyla MSP'deki dezavantajlar bu yöntem içinde geçerlidir. Fakat güvenilirliği ve duyarlılığı MSP'ye göre yüksektir. Ama yine de yöntemin maliyeti oldukça yüksektir. Bizim olgularımızın epigenetik analiz amaçlı DNA metilasyon profili çalışmaları yüksek özgünlük ve duyarlılığa sahip Metil spesifik MLPA (MS-MLPA) tekniği ile gerçekleştirilmiştir. MS-MPLA kiti içerisinde tanımlanmış tümör supresör genler için tasarlanmış özgün dizilimlere sahip sentetik probalar yer almaktadır. Uygun PCR ortamında hibridize olan problemlerin amplifikasyonu ile metilasyon paterni değerlendirilebilmiştir. Çalışma grubumuzda yer alan tazedden dokudan izole edilmiş DNA örnekleri normal şartlarda MS-MLPA tekniği için uygundur fakat mevcut DNA örneklerinin çok yıllık olması, DNA izolasyonu sırasında kullanılan reaktiflerin uzun ömürlülüğü ve hangi koşullarda saklandığı bilinmediği için bir takım olumsuzluklarla gerçekleşmiştir. Bu sebeplerden dolayı analiz sonuçlarında zaman zaman DNA miktarı düşük olan örneklerde saptanan pik kalitesinin değerlendirilemeyecek düzeyde olma durumu ile karşılaşıldı. Bazı örneklerde kapiller jel elektroforezinin ilk aşamalarında kaliteli pik elde edilirken devamında pik yüksekliğindeki düşüklükler analizleri ettiğimiz için çalışma değerlendirilmeye alınmamıştır. Dolayısıyla elde ettiğimiz kazanımlarla bir MS-MLPA çalışması için kullanılacak DNA miktarının ve kalitesinin önemi

anlaşılmıştır. DNA miktarının yetersiz ve kirli olması elde edilen piklerin kalitesini düşürmekte ve pik analizinde sıkıntılara, yanlış-pozitif ya da yanlış-negatif sonuç alınmasına neden olmaktadır. Bu tip olumsuzluklar dışında yöntem diğer pek çok tekniğe göre avantajlı ve ekonomik bulunmuştur. Çalışmada elde edilen sonuçların literatürdeki diğer oranlara göre farklı saptanması, her genin promotor bölgesinde incelenen CpG adacık bölgeleri ile diğer çalışmalarda incelenen bölgeler arasındaki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir.

Kolorektal kanser gelişiminde gözlenen ilk genetik aşama APC yolağının inaktivasyonudur. Diğer tümör baskılayıcı genlerdeki (SMAD2, SMAD4, TP53 gibi) ve onkogenlerdeki (KRAS gibi) mutasyonların oluşumuyla başlangıçta oluşan lezyonların patolojisini değiştirerek kötü huylu (normal hücrenin kanser hücresine dönüşümü) oluşumların ve metastaz yapabilme yeteneğinin kazanılmasının önünü açar. Dolayısıyla yapılan bizim sonuçlarımızda elde ettiğimiz %100 APC inaktivasyon oranı literatürdeki çalışmalar uyumludur. Geçmişe yönelik yapılan taramalarda saptanmış olan APC hipermetilasyon oranı oldukça yüksektir. Cho ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada göğüs kanseri hastalarının tümör dokularında %52,5 oranında APC promotor bölgesi metilasyonu gözlenirken, kontrol grubu olarak kullandıkları beyaz kan hücrelerinde metilasyon bulunmamıştır (Cho ve ark., 2010). Mide kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada ise %82,5 oranında (33/40) APC metilasyonu gözlenmiştir (Tsuchiya ve ark., 2000). Grote ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bronşial aspirasyon materyalinden APC geninin kantitatif metilasyon analizleri %98,5 spesivite ve %39'luk sensitivite ile primer akciğer kanserlerinde biomarker olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Grote ve ark., 2005). Literatürlerde RealTime PCR yöntemiyle bulunan metilasyon oranları diğer çalışmalara göre daha yüksek olarak bildirilmiştir. Buna göre Arvind ve arkadaşları APC geninin metilasyon profilini Methylight RealTime PCR (RT PCR) tekniği ile araştırmışlar ve %74 oranında metilasyon saptamışlardır (Arvind ve ark., 2002). Benzer şekilde Grote ve arkadaşlarının RealTime PCR ile yaptıkları çalışmada APC promoter metilasyon oranı %71 olarak bildirilmiştir (Grote ve ark., 2005). Bu yüksek oranların tekniğin yüksek duyarlılığından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada APC promotor metilasyonunun mide kanseri hastalarında sıklıkla meydana geldiği

belirtmiştir. Çalışmada kullanılan sağlıklı mide dokusu örneklerinde APC promotor metilasyonu gözlenmiştir. Fakat bu metilasyonunun sadece bir allele meydana geldiği, kanser oluşumu ile birlikte metilasyon oranının arttığı belirtilmiştir (Clement ve ark., 2004). Literatürdeki bir başka çalışmada metastazik kolorektal tümörlerinde APC promotor metilasyonunun arttığı ve buna bağlı olarak APC proteininin hücrelerde azaldığı belirlenmiştir. Metastaz yapılan bölgede APC proteininin seviyesinde herhangi bir azalma gözlenmemiştir. Bunun sonucunda, metastaz yapan kanser hücrelerinin gittikleri yerlerde genetik ve epigenetik değişikliklere karışık bir şekilde maruz kaldıkları ve böylece APC ifadesinden bağımsız olarak APC promotor metilasyonu meydana getirebilecekleri düşünülmüştür (Chen ve ark., 2005).

Promotor CpG adasında DNA hipermetilasyonu transkripsiyonel gen sessizleşmesi ile ilişkilidir ve kolorektal tümörögenезisi için anahtar rol oynayan sinyal yolaklarını değiştiren diğer genetik mekanizmalar ile işbirliği söz konusu olabilir (Baylin ve Ohm, 2006). DNA hipermetilasyonu bazı CIMP ilişkili gen promotorları kolorektal tümörögenезisin erken safhalarında saptanmıştır (İbrahim ve ark., 2011). Bazı grupların son yaptığı çalışmalarda KRAS mutasyonu olan kolorektal tümörlerin özgün bir DNA metilasyon profili ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir.

Çalışmamızda BRCA1 ve BRCA2 genlerinde metilasyon saptanmamıştır. Benzer bir çalışmada BRCA1 geninde metilasyon saptanmadığı gösterilmiştir. Buna göre Çin'de yapılan bir araştırmada 31 genin promotor bölge CpG adası metilasyon profilinin kolorektal kanserde rol alabileceği görülmüştür. Bu çalışmada 65 kolorektal kanser, 5 kanser içermeyen komşu doku, 8 kolorektal adenom ve 1 normal mukozada 31 genin promotor CpG adası metilasyon profili MS-PCR ile analiz edildi ve kanser olmayan hastalar çalışmada referans alınarak metilasyon sonuçları değerlendirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre 14 genin; BRCA1, CDH1, DAPK1, DNMT1, MAGEA1, N33, p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, PTEN, RAR, RASSF1C, SFRP1, TIMP3 ve VHL metilasyon profilinde tümörle ilişki bir değişim görülmemiştir. Bazı genlerde ise tümörle ilişkili metilasyon değişimi görülmüş olup; APC %8 (5/65), RASSF1A %3 (2/65), ve p14^{ARF} %6 (4/65) genlerinde önemsiz olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte diğer genlerde kanserli doku içermeyen

mukozaların metilasyon paterni sapmalarında önemli değişimler görölmüştür. MGMT %20 (13/65), hMLH1 %18 (12/65), p16^{INK4a} %10 (10/65), MINT1 %15,4 (10/65), MINT31 %11 (7/65) genlerinde orta seviyede metilasyon değişimi gözlemlenirken; COX2 %72, (47/65), cyclin A1 %100 (65/65), CDX1 %100 (65/65), RAR-b %85 (55/65), MYOD1 %69 (45/65), p15^{INK4b} %68 (44/65), CDH13 %66 (43/65), CXX1 %58 (38/65), p73 %63 (41/65), ve WT1 %58 (38/65) genlerinde yüksek seviyedeki oranlarda değişim görölmüştür. Wagner ve arkadaşlarının CRC'de RASSF1A genine ait promotor bölge metilasyon araştırması yapmışlardır ve kolorektal kanser hücre hattında %80 (4/5) ile birincil kolorektal kanserlerde %45 (13/29) oranında RASSF1A metillenme olduğunu gözlemlemişlerdir (Wagner ve ark., 2002). Daha önceki çalışmalarda aynı genin metilasyon paterni karaciğer primer kanserlerinden hepatosellüler kanserde (HCC) araştırılmış %100 aşırı metillenme (hipermetilasyon) saptanmıştır. (Yu ve ark., 2002) Ancak Xiao-Li Xu ve arkadaşlarının yaptığı kolorektal kanserde 31 genin metilasyon profili çalışmasında RASSF1A geninin %3 oranında aşırı düşük (hipometilasyon) saptanmıştır (Xu ve ark., 2004)

Yaş ve çevresel faktörler kanser ve neoplazma oluşumuna neden olabilir. Bu süreç genellikle hücre artışı, göç, apoptozis, farklılaşma, büyüme ile ilgili genlerin ifade edilmesindeki değişimler ve kromozomal instabilitesi, genetik düzenlemeler, mutasyonlar ya da promotor hipermetilasyonundan dolayı olabilen değişimler sonucu gelişir. Nilsson ve arkadaşları kolorektal kanserli hastalara ait tümör dokularında kolorektal kanser gelişimi nedenlerinden biri olan promotor bölge hipermetilasyonunu analiz etmek için DNA tamir geni O⁶-MGMT ve tümör supressör genlerden APC1A, p14^{ARF}, RASSF1A ve p16^{INK4alfa} genlerinin metilasyon paternini ile hayatta kalma arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Çalışmada 111 birinci derece kolorektal kanser hastasına ait tümör dokusu ve aynı gruptan 46 normal kolorektal mukozası yer almıştır. Beş genin CpG adası promotor bölge metilasyon analizi, metilasyon spesifik PCR ile DNA dizi analizi ise geliştirilmiş payrosekans analizi ile değerlendirilmiştir. Normal kolon mukozasında hiç metillenme olmazken, tümöral biyopsi materyallerinden çalışmaya alınan tümör dokularından izole DNA örneklerinde; O⁶-MGMT geninde %34, p14^{ARF} geninde %29, p16^{INK4alfa} geninde %28, APC1A geninde %27 ve en az oran ile RASSF1A

geninde %14 metillenme saptanmıştır. Analiz sonucunda KRK'li hastaların yaşam süresi bu genlerin promotor bölge metilasyon oranı arasında bağlantı kurulduğunda, p14^{ARF} genin metilasyonu hiç metillenme olmayan hastalar ile karşılaştırıldığında daha kısa yaşam süresi ile oldukça önemli bir ilişkisi olduğu görülmüştür. Ayrıca APC1A ve RASSF1A genlerinin promotor bölgelerinde metilasyon varlığında daha kötü prognoza doğru eğilimin olduğunu ifade edilmiştir (Nilsson ve ark., 2013). Bir başka çalışma ise tümör dokusunda APC1A geni metillenmiş hastalarda yaşam süresinin daha uzun olduğu iddia edilmiştir (Chen ve ark., 2009).

Kolorektal kanserde farklı coğrafik bölgelerde çok geniş çapta metilasyon oranları görülmektedir. Bununla birlikte KRK patogenezisinde mutasyonel değişimler ve epigenetik mekanizmalar da önemli rol oynamaktadırlar. Mokarram ve arkadaşları kolorektal kanser çalışmasında 92 birinci derece sporadik tümör ve sonuçları karşılaştırma için daha önceki çalışmalarında (Naghibalhossaini ve ark., 2011) kullandıkları normal doku örneklerine yer vermişlerdir. Tümöral dokularda O⁶-MGMT (O6-metilguanin-DNA metiltransferaz) geninin promotor bölgesi için MGMT-A ve gen gövdesinin başlangıç kısmı için MGMT-B şeklinde iki kısma ayırarak MS-PCR ile metilasyon paterni incelenmiştir. MGMT geninin başlangıç kodonu yakınlarında hipermetilasyon gözlemlenmiştir. MGMT-A'da %53,8 (49/91) ve MGMT-B'de %90,2 (83/92) metillenme saptanmıştır. MGMT geninin inaktif olması durumunda *K-ras* ve p53 gibi spesifik genlerde guanin bazının adenin bazına dönüşümü birikebilir bu nedenle kanser gelişiminde kritik bir role sahiptir (Mokarram ve ark., 2013). Bazı kolorektal kanserler MGMT'nin epigenetik inaktivasyonu aracılığıyla defekt alanlarda bulunduğu ve hastalık için markır olabileceği ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise hem MGMT (191 nt) hem de MGMT (346 nt)'de promotor bölge metilasyon oranı %10 olarak saptanmış olsa da diğer araştırmalarda bu anormalliğin daha yüksek saptanması kolorektal kanser riskini değerlendirmek için oldukça önemli bulunmuştur (Shen ve ark., 2005).

KRK'de DNA tamirinde görevli MGMT geni sıklıkla metillenmiştir. Ayatollahi ve arkadaşları MGMT promotor metilasyonunun kolon mukazında kanserli alanların beliryeci adaylarından biri olabileceğini göstermeye çalışmışlardır. QMSP (Quantatif Metilasyon-Spesifik PCR) tekniği ile 40 kolon kanseri hastasından tümör dokusu ve tümör dokusundan 5-10 cm uzaklıktaki örnekler ile kanser bulgusu

olmayan 30 kontrol grubunun kolon mukozasında MGMT metilasyonunu analiz etmişlerdir. Yapışık tümörlerde MGMT promotor metilasyonu olan normal örneklerde %36,36 (4/11), MGMT metilasyonu olmayan yapışık tümör örneklerinde %20,79 (6/29) ve kontrol örneklerinde %6,66 (2/30) oranında metilasyon saptanmıştır. Sonuç olarak MGMT epigenetik inaktivasyonu bazı kanserler için tümör alanlarının belirlenmesinde yol gösterici olabilir. (Ayatollahi ve ark., 2013).

Tez çalışmamızda sporadik kolorektal kanseri olgularında DNA tamir bozukluklarından hatalı eşleşme onarımındaki yetersizlikten kaynaklı gelişen MSH6 geninde yapılan promotor bölge metilasyon analizinde %60 (12/20) oranında metillenme tespit edilmiştir. Hatalı eşleşme onarım mekanizması genlerinde mutasyon olan bireylerin kalıtsal non polipozal kolon kanserine yatkın oldukları tespit edilmiştir (Stojic ve ark., 2004). Hatalı eşleşme onarımının eksik olduğu kanserlerin çoğunlukla diploid olması, çok fazla genomik kararsızlığın hücre için bir dezavantaj olduğunu düşündürmektedir. MSI, Lynch sendromlu (HNPCC) kolorektal kanserli hastaların %90'ından fazlasında meydana gelmektedir ve bu yüzden hastalık için uygun bir markırdır. Berginc ve arkadaşlarının Slovenya popülasyonunda yürüttüğü bir çalışmada Lynch sendromlu hastalarda hatalı eşleşme onarım mekanizması genlerinden MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2'nin rolünü ortaya koymaya amaçlamışlardır. Çalışmalarında 593 KKK hastası üzerinde MSI analizi yapmışlardır. MSI yüksek olan hastalarda MLH1 promotor hipermetilasyon oranı %7,3 (43/593) ile bunlar içerisindeki 7 hasta MLH1'de 2, MSH2'de 4, PMS2'de 1 ve MSH6'da hiç defekti bulunmayan germline defekti barındırmaktadır. Germline defekti bulunmayan ve bir tanesinde Lynch sendromu olduğu düşünülen hastaların %56'sında MLH1 promotor bölge metilasyonu saptanmıştır. Bu yüzden MSH6 mutasyonları kolorektal kanserde minor rol oynamaktadır. Germline mutasyon bulgusu olmayan tümör tespit edildiğinde PMS2 ve MSH6 genlerinde germline defektlerin varlığı için gerekli testlerin daha sonraki aşamalarda yapılması sonucuna varılmıştır.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin promotör olarak adlandırılan kontrol bölgelerinde epigenetik modifikasyonların olması, tümör supresör ve onkogenlerin ifadelenmelerinin kontrolünde bozulmalara (de-regülasyonu) neden olarak kolorektal kanser gelişiminde etkili olmaktadır. Kolorektal kanser gelişiminde gözlenen ilk genetik aşama APC yolağının inaktivasyonudur. Diğer tümör baskılayıcı genlerdeki ve onkogenlerdeki mutasyonların oluşumuyla başlangıçta oluşan lezyonların patolojisini değiştirerek kötü huylu tümör oluşumların ve metastaz yapabilme yeteneğinin kazanılmasının önünü açmaktadır. Çalışmamızda kolorektal kanser tanılı 20 hasta bireye ait tümör dokudan elde edilen genomik DNA izolasyonlarının MS-MLPA tekniği ile promotor bölge metilasyon profillerini ortaya koymak amaçlı önceliğimiz tümör supresör APC geni ve beraberinde TP53, MGMT (191 nt), MGMT (346 nt), MSH6 ve BRCA1, BRCA2 genlerine ait promotor bölge metilasyonları ortaya konulmuştur. Yapılmış olan literatür taramalarında gerek çalışma tekniklerindeki duyarlılık farkından gerekse çalışma popülasyonu farklılıklarından dolayı elde edilen hem APC geni hem de diğer tümör supresör genlerin promotor bölge metilasyon oranları değişkenlik göstermektedir. Ayrıca bu değişkenlikler her genin promotor bölgesinde incelenen CpG adacık bölgeleri arasındaki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir. Deneyler sonuçlarında APC geni %100, TP53 ve MSH6 genleri %60, MGMT (191 nt) ve MGMT (346 nt) genleri %10 oranında metilasyon saptanmıştır. Bu araştırmalardan çıkan sonuç APC geninin promotor bölgesindeki metilasyonunun incelenmesinde kullanılacak yöntemin duyarlılığı oldukça önemli olduğudur. MS-MLPA yönteminin yüksek duyarlılığından dolayı çalışılacak DNA örneklerinin izolasyonu için kullanılan reaktiflerin ve sonucunda elde edilen DNA'nın kalitesi ve miktarı çok iyi ayarlanması gerekmektedir. Birlikte çalışılacak grupların aynı hasta grubuna ait olmasına özen gösterilmelidir, bunun dışında DNA örneklerinin aynı yöntemle izole edilmelerine dokudan izole DNA örneklerinde sık karşılaşılan artefakların çalışmayı olumsuz etkileyeceği için mümkünse periferik kandan izole genomik DNA eldilmesi tavsiye edilir. Ayrıca DNA miktarının yetersiz ve kirli olması elde edilen piklerin kalitesini düşürmekte ve pik analizinde sıkıntılara, yanlış-pozitif ya da yanlış-negatif sonuç alınmasına neden olmaktadır. Tüm bunlara dikkat edildiğinde MS-MLPA

tekniği tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgesinde meydana gelen metilasyon profillerini belirleyebilmek için var olan yöntemlerden en verimlisidir. Yöntemi avantajlı yapan aynı anda çok sayıda gen bölgesinin metilasyon profilini aynı anda inceleyebilme imkanı vermesi, etkin, ucuz, kolay ve hızlı olmasıdır. MS-MLPA'nın duyarlılığı ve hassasiyetinin belirlenmesi için geniş araştırma popülasyonlarında farklı yöntemlerin aynı zamanda uygulanması ve sonuçların karşılaştırılması gerektiği görüşündeyiz. En önemli hastalıklardan biri olan kanserin teşhisinde tümör belirteci olarak promotor bölgesi metilasyonunun belirlenmesiyle ilgili yapılacak kapsamlı çalışmaların, önemli bilgileri ortaya çıkaracağı düşünülmektedir. Son olarak epigenetik çalışmalar, kanser vakalarında tümörlü dokuya özgü tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik araştırmaların daha fazla yapılması hem erken tanı ve tedavide hem de sağkalım oranlarının artmasında oldukça yararlı olacaktır.

8. KAYNAKLAR

- American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2013. Atlanta, Ga: American Cancer Society. Also available online, Last accessed: 22.01.2013.
- Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993; 90(24):11-995-9.
- Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (*APC*): A multifunctional tumor suppressor gene. Journal of Cell Science. 2007; 120:3327-3335.
- Arasaradnam RP, Commane DM, Bradburn D, Mathers JC. A review of dietary factors and its influence on DNA methylation in colorectal carcinogenesis. Epigenetics. 2008; 3(4):193-8.
- Arvind K, Tsou JA, Siegmund KD, Shen YC. Hierarchical clustering of lung cancer cell lines using NA methylation marker. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. 2002;11, p.291-297.
- Ayatollahi H, Farzanehfar M, Vossoughinia F, Jabini R, Tavassoli A, Saadatnia H, Khorashad AK, Ahadi M, Afzalaghaee M, Karimiani EG and Mirzaei F. DNA and Cell Biology. July 2013; 32(7):371-377.
- Badal V, Chuang LS, Tan EH, Badal S, Villa LL, Wheeler CM, Li BF, Bernard HU. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: Genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. Journal of Virology. 2003; 77(11):6227-34.
- Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer a mechanism for early oncogenic pathway addiction?. Nature Reviews Cancer. 2006; (6)107-116.
- Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications. Nature Reviews Cancer. 2011; 11(10):726-34.
- Bedford MT, van Helden PD. Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate. Cancer Research. 1987; 47(20):5274-6.
- Ben Gacem R, Hachana M, Ziadi S, Ben Abdelkarim S, Hidar S, Trimeche M. Clinicopathologic significance of DNA methyltransferase 1, 3a and 3b overexpression in Tunisian breast cancers. Human Pathology. 2012; 43(10):1731-8.
- Billam M, Sobolewski MD, Davidson NE. Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. Breast Cancer Reserach and Treatment. 2010; 120(3):581-92.
- Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. Nature 1987; 328:614-616.
- Brothman AR, Swanson G, Maxwell TM, Cui J, Murphy KJ, Herrick J, Speights VO, Isaac J, Rohr LR. Global hypomethylation is common in prostate cancer cells: A quantitative predictor for clinical outcome?. Cancer Genetics Cytogenetics. 2005; 156-(1):31-6.

- Carone DM, Lawrence JB. Heterochromatin instability in cancer: From the Barr body to satellites and the nuclear periphery. *Seminars in Cancer Biology*. 2012; 23(2):99-108.
- Cedar H, Bergman Y. Programming of DNA methylation patterns. *Annual Review of Biochemistry*. 2012; 81:97-117.
- Chen J, Röcken C, Lofton-Day C, Schulz H-U, Müller O, Kutzner N, Malfertheiner P, Ebert PA. Molecular analysis of *APC* promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis. *Carcinogenesis*. 2005; 26(1):37-43.
- Chen SP, Chiu SC, Wu CC. The association of methylation in the promoter of *APC* and *MGMT* and the prognosis of Taiwanese CRC patients. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2009; 13:67-71.
- Chervona Y, Costa M. Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis. *American Journal Of Cancer Researchs*. 2012; 2(5):589- 97.
- Cho YH, Yazıcı H, Wu HC, Terry MB, Gonzalez K, Qu M, Dalay N, Santella RM. Aberrant promoter hypermethylation and genomic hypomethylation in tumor, adjacent normal tissues and blood from breast cancer patients. *Anticancer Research*. 2010; 30:2489-2496.
- Clement G, Bosman FT, Fontollet C, Benhattar J. Monoallelic methylation of the *APC* promoter is altered in normal gastric mucosa associated with neoplastic lesions. *Cancer Research*. 2004; 64:6867-6873.
- Cooper DN. Eukaryotic DNA methylation. *Human Genetics*. 1983; 64,315-33.
- Corman ML, Allison SI, Kuehne JP. *Handbook of Colon and Rectal Surgery* by Lippincott Williams and Wilkins 530 Walnut street Philedelphia. PA 196 USA. 2002; 423-7.
- Cremonesi L, Ferrari M, Giordano PC, Hartevelde CL, Kleanthous M, Pappasavva T, Patrinos GP, Traeger SJ. An overview of current microarray based human globin gene mutation detection methods. *Hemoglobin*. 2007; 31(3):289-311.
- Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell*. 2012; 150(1):12-27.
- Dijk MCV, Rombout PD, Boots SSH, Straatman H, Bernsen MR, Ruitter DJ, Jeuken JW. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification for the detection of chromosomal gains and losses in formalin-fixed Tissue. *Diagnostic Molecular Pathology*. 2005; 14(1):9-16.
- Diñçer Y, Akçay T. DNA Hasarı. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2000; 25,2:73-79.
- Doğu GG, Çıtıl R, Dikilitaş M, Özkan M, Er Ö, Öztürk A, Altınbaş M. Kemoterap alan hastaların sosyodemografik ve tanısal özellikleri. *Erciyes Tıp Dergisi*. 2007; 29(2),132-138.
- Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*. 2009; 1(2):239-59.
- Engin K. Meme Kanseri. *Nobel Tıp Kitabevleri*. 2005; s.1, 55-57,87-90,625-626.
- Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of *APC*. *Human Molecular Genetics* 2001;10:721-733.

- Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983; 301(5895):89-92.
- Fenoglio-Preiser CM, Compton CC, Pettigrew N, Fielding LP. American joint committee on cancer prognostic factors consensus conference: Colorectal working group. *Cancer*. 2000; 88:1739-1757
- Flotho C, Claus R, Batz C, Schneider M, Sandrock I, Ihde S, Plass C, Niemeyer CM, Lübbert M. The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 2009; 23(6):1019-28
- Fraga MF, Herranz M, Espada J, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Erkek E, Bozdogan O, Peinado H, Niveleau A, Mao JH, Balmain A, Cano A, Esteller M. A Mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Research*. 2004; 64(16):5527-34.
- Gerhauser C. Cancer chemoprevention and nutri-epigenetics: State of the art and future challenges. *Topics Current Chemistry*. 2012.
- Girault I, Tozlu S, Lidereau R, Bièche I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clinical Cancer Research*. 2003; 9(12):4415-22.
- Goel A. DNA methylation-based fecal biomarkers for the noninvasive screening of GI cancers. *Future Oncology*. 2010; 6(3):333-6.
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A landscape takes shape. *Cell*. 2007; 128(4):635-8.
- Gonzalez JR, Carrasco JL, Armengol L, Villatoro S, Jover L, Yasui Y, Estivill X. Probe-specific mixed-model approach to detect copy number differences using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *BioMed Central Bioinformatics*. 2008; 9:261.
- Gouas L, Goumy C, Veronese L, Tchirkov A, Vago P. Gene dosage methods as diagnostic tool for the identification of chromosome abnormalities. *Pathologie Biologie (Paris)*. 2008; 56(6):345-353.
- 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.
- Gros C, Fahy J, Halby L, Dufau I, Erdmann A, Gregoire JM, Ausseil F, Vispé S, Arimondo PB. DNA methylation inhibitors in cancer: Recent and future approaches. *Biochimie*. 2012; 94(11):2280-96.
- Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, Rohr UP. Aberrant promoter methylation of p16, RARB2 and SEMA3B in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. *International Journal of Cancer*. 2005; 116,p720-725.

- Gupta A, Godwin AK, Vanderveer L, Lu A, Liu J. Hypomethylation of the synuclein gamma gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma. *Cancer Research*. 2003; 63(3):664-73.
- Hamilton SR, Aaltonen LA (Eds). World Health Organization (WHO) classification of tumors: Pathology and genetics of tumors of the digestive system. IARC Press, Lyon. 2000.
- Hanson CA, Miller JR. Non-traditional roles for the Adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor protein. *Gene*. 2005; 361:1-12.
- Hassler MR, Egger G. Epigenomics of cancer emerging new concepts. *Biochimie*. 2012.
- Hatziapostolou M, Iliopoulos D. Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011; 68(10):1681-702
- Holwerda S, de Laat W. Chromatin loops, gene positioning, and gene expression. *Frontiers in Genetics*. 2012; 3:217.
- Holz-Schietinger C, Reich NO. The inherent processivity of the human de novo methyltransferase 3A (DNMT3A) is enhanced by DNMT3L. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285(38):29091-100.
- Ibrahim AE, Arends MJ, Silva AL, Wyllie AH, Greger L, Ito Y, Vowler SL, Huang TH, Tavaré S, Murrell A. Sequential DNA methylation changes are associated with DNMT3B overexpression in colorectal neoplastic progression. *Gut*. 2011; 60:499-508.
- İnsan 5. Kromozomuna lokalize APC geni. Erişim adresi: www.ensembl.org, Erişim Tarihi: 14 04.2014).
- Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009; 461(7267):1071-8.
- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*. 2003; 33 Supplements:245-54.
- Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007; 50:113-130.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer Journal of Clinical Oncology*. 2011; 61(2):69-90.
- Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*. 2001; 293(5532),1068-70.
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007; 128:683-692.
- Jurkowska RZ, Rajavelu A, Anspach N, Urbanke C, Jankevicius G, Ragozin S, Nellen W, Jeltsch A. Oligomerization and binding of the Dnmt3a DNA methyltransferase to parallel DNA molecules: Heterochromatic localization and role of Dnmt3L. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286(27):24200-7.
- Kılıç N. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Palme, Türkiye. 2005; p.950-957.

- Kim KH, Choi JS, Kim IJ, Ku JL, Park JG. Promoter hypomethylation and reactivation of MAGE-A1 and MAGE A3 genes in colorectal cancer cell lines and cancer tissues. *World Journal of Gastroenterology*. 2006; 12(35):5651-7.
- Kim WJ, Kim YJ. Epigenetics of bladder cancer. *Methods in Molecular Biology*. 2012; 863:111-8.
- Kingston HM. ABC of clinical genetics, 3rd Ed. BMJ Books. 2002; p.56.
- Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*. 2006; 31(2):89-97.
- Kolon kanseri tarama istatistikleri. Erişim adresi: <http://www.kanser.gov.tr>, Erişim Tarihi: 6.05.2014
- Kozłowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments In the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*. 2008; 29(23):4627-4636.
- Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Advances in Genetics*. 2010; 70:27-56.
- Lansdorp PM, Falconer E, Tao J, Brind'amour J, Naumann U. Epigenetic differences between sister chromatids. *Annals of the New York Academy*. 2012; 1266(1):1-6.
- Li Y, Zhu J, Tian G, Li N, Li Q, Ye M, Zheng H, Yu J, Wu H, Sun J, Zhang H, Chen Q, Luo R, Chen M, He Y, Jin X, Zhang Q, Yu C, Zhou G, Sun J, Huang Y, Zheng H, Cao H, Zhou X, Guo S, Hu X, Li X, Kristiansen K, Bolund L, Xu J, Wang W, Yang H, Wang J, Li R, Beck S, Wang J, Zhang X. The DNA methylome of human peripheral blood mononuclear cells. *Plos Biology*. 2010; 9:8(11).
- Li Y, Tollefsbol TO. Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components. *Current Medicinal Chemistry*. 2010; 17(20):2141-51.
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 2009; 462(7271):315-22.
- Lynch HT, Lynch IF. Genetics of colorectal cancer. *Digestion*. 1998; 59:481-492.
- Martín-Subero JI. How epigenomics brings phenotype into being. *Pediatric Endocrinology*. 2011; 9 Supplement1:506-10.
- Michalowsky LA, Jones PA. DNA methylation and differentiation. *Environmental Health Perspectives*. 1989; 80:189-97.
- Miller CA, Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*. 2007; 53(6):857-69.
- Mokarram P, Zamani M, Kavousipour S, Naghibalhossaini F, Irajie C, Moradi Sarabi M, Hosseini SV. Different patterns of DNA methylation of the two distinct O6- methylguanine-DNA methyltransferase (O6-MGMT) promoter regions in cancer. *Molecular Biology Reports*. 2013; 40:3851-3857.

- Naghbalhossaini F, Hosseini HM, Mokarram P, Zamani M. High frequency of genes' promoter methylation, but lack of braf v600e mutation among iranian colorectal cancer patients. *Pathology and Oncology Research*. 2011; doi: 10.1007/s12253-011-9388-5.
- Nakagawa T, Kanai Y, Saito Y, Kitamura T, Kakizoe T, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase 1 protein expression in human transitional cell carcinoma of the bladder, *Journal of Urology*. 2003; 170(6 Pt 1):2463-6.
- Nakamura Y, Nishisho I, Kinzler KW, Vogelstein B, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Nagase H. Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in familial polyposis coli patients and sporadic colorectal tumors. *Princess Takamatsu Symposia*. 1991; 22:285-92.
- Ndlovu MN, Denis H, Fuks F. Exposing the DNA methylome iceberg. *Trends in Biochemical Sciences*. 2011; 36(7):381-7.
- Nguyen C, Liang G, Nguyen TT, Tsao-Wei D, Groshen S, Lübbert M, Zhou JH, Benedict WF, Jones PA. Susceptibility of nonpromoter CpG islands to de novo methylation in normal and neoplastic cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001; 93(19):1465-72.
- Nilsson TK, Löf-Öhlin ZM and Sun XF. DNA methylation of the p14^{ARF}, RASSF1A and APC1A genes as an independent prognostic factor in colorectal cancer patients. *International Journal of Oncology*. 2013; 42:127-133.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999; 99 (3):247-57.
- Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve kanser. Erişim adresi: <http://www.spektromar.com.tr>, Erişim Tarihi: 01.05.2014
- Podlaha O, Riester M, De S, Michor F. Evolution of the cancer genome. *Trends in Genetics*. 2012; 28(4):155-63.
- Pogribny IP, Rusyn I. Environmental toxicants, epigenetics and cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013; 754:215-32.
- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*. 2010; 28(10):1057-68.
- Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B and Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nature Reviews Genetics*. 2002; 3:695-701.
- Rando OJ. Combinatorial complexity in chromatin structure and function: Revisiting the histone code. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2012; 22(2):148-55.
- Robert S. Malignant neoplasms of the large intestine. In: Mark Feldman, *Gastrointestinal and Liver Disease*, 9th Ed. Saunders Elsevier. 2010; Vol 2, Chapter123, 2191-2238.
- Robertson KD. DNA methylation and chromatin unraveling the tangled web. *Oncogene*. 2002; 21(35):5361-79.
- Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: Beyond genomics. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2012; 22(1):50-5.

- Sayın DB. Metilasyon ve kanser. *Türkiye Klinikleri*. 2008; 28:513-524.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Reserach*. 2002; 30(12):57.
- Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: New Techniques for Detection of Gene Deletions. *Human Mutation*. 2004; 23(5):413-419.
- Seifert HH, Schmiemann V, Mueller M, Kazimirek M, Onofre F, Neuhausen A, Florl AR, Ackermann R, Boecking A, Schulz WA, Grote HJ. In situ detection of global DNA hypomethylation in exfoliative urine cytology of patients with suspected bladder cancer. *Experimental and Molecular Pathology*. 2007; 82(3):292-7.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31(1):27-36.
- Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao R, Hernandez NS, Vilaythong J, Houlihan PS, Krouse RS, Prasad AR, Einspahr JG, Buckmeier J, Alberts DS, Hamilton SR, Issa JP. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. September 21, 2005; Vol.7, No.18.
- Smallwood SA, Kelsey G. De novo DNA methylation: A germ cell perspective. *Trends in Genetics*. 2012; 28(1):33-42.
- Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signaling. *DNA Repair Review (Amsterdam)*. 2004; 3(8-9):1091-101.
- Tsuchiya T, Tamura G, Sato K, Endoh Y, Sakata K, Jin Z, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, Wilson KT, James SP, Yin J, Fleisher AS, Zou T, Silverberg SG, Kong D, Meltzer SJ. Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia. *Oncogene*. 2000; 19:3642-3646.
- Umer M, Herceg Z. Deciphering the epigenetic code: An overview of DNA methylation-analysis methods. *Antioxid Redox Signal*. May 20, 2013; 18(15):1972-1986.
- Waddington CH. The epigenotype. 1942. *International Journal of Epidemiology*. 2012; 41(1):10-3.
- Wagner KJ, Cooper WN, Grundy RG, Caldwell G, Jones C, Wadey RB, Morton D, Schofield PN, Reik W, Latif F, Maher ER. Frequent RASSF1A tumour suppressor gene promoter methylation in Wilms' tumour and colorectal cancer. *Oncogene*. 2002; 21:7277-7282
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal tumor development. *The New England Journal of Medicine*. 1988; 319:525-32.
- Vogelstein B, Kinzler KW. P53 function and dysfunction. *Cell*. 1992; 70:523-526.
- Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Barbara AL. Colorectal carcinogenesis: Road maps to cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2007; 13(28),3784-3791.

- Yamada T, Nakamori S, Ohzato H. Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: Correlation with clinicopathological features. *Clinical Cancer Research*. 1998; 4,1527-1532.
- Yan L, Nass SJ, Smith D, Nelson WG, Herman JG, Davidson NE. Specific inhibition of DNMT1 by antisense oligonucleotides induces re-expression of estrogen receptoralpha a (ER) in ER-negative human breast cancer cell lines. *Cancer Biology and Therapy*. 2003; 2(5):552-6.
- Yu J, Ni M, Xu J, Zhang H, Gao B, Gu J, Chen J, Zhang L, Wu M, Zhen S, Zhu J. Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis. *BMC Cancer*. 2002; 2:29.
- You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: Two sides of the same coin?. *Cancer Cell*. 2012; 22(1):9-20.
- Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Gu J, Du X, Shi DR, Wang P, Yang ZH, Zhu JD. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2004;10(23):3441-54.

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Ebru	Soyadı	ŞIK
Doğum Yeri	Aydın/Söke	Doğum Tarihi	05.10.1989
Uyruğu	T.C	TC Kimlik No	23842323670
E-mail	ebru@stu.comu.edu.tr	Tel	05369665043

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2012-2014
Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi	2008-2012

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.		-

Yabancı Dil Sınav Notu[#]

KPDS	ÜDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFLPBT	TOEFLCBT	FCE	CAE
	56							

A-Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Diğer:

A-Uluslararası yayınlar

A-1. Ozen F, Erdiz E, **Sik E**, Silan F, Uludag A, Ozdemir O. Germ-line MTHFR C677T, FV H1299R and PAI-1 5G/4G variations in breast carcinoma. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2013;14(5):2903-8.

A-2.Gazi E, Barutcu A, Altun B, Temiz A, Bekler A, Urfali M, Silan F, Colkesen Y, Ozdemir O. Intercellular Adhesion Molecule-1 K469E and Angiotensinogen T207M Polymorphisms in Coronary Slow Flow. Medical Principles and Practice. 2014; DOI: 10.1159/000363451.(Technical Support; **Sik E.**)

B-Uluslararası Bildiriler

B-1. Silan F, Yalcıntepe S, Uysal D, Urfali M, **Sik E**, Uludag A, Cosar E, Cakir Gungor N., Ozdemir O. High frequency of chromosomal anomalies and a novel chromosomal insertion associated with infertility and recurrent miscarriages(Reproductive Failure) in west Turkey. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. P13.16.

B-2.S. Oguz, F. Silan, Ç. AKURUT, N. Topaloglu, S. Isik, **E. Sik**, A. Uludag, Z. Ogretmen, O. Ozdemir. Correlation between vitamin D receptor gene polymorphisms and atopic dermatitis in Canakkale population: a study based on, FokI and TaqI RFLP technique. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY.J04.06.

C-Ulusal Bildiriler

C-1.Ozen F, **Ercis E**, Sik E, Ozdemir O. Germ-line MTHFR C677T, ACE I/D and PAI-1 4g/5g variations in the familiar breast carcinoma. 10. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s. 207, 19-23 Aralık 2012, Bursa.

C-2.Sılan F, Urfalı M,Güneş F,Topaloglu N, **Sik E**, Kankaya D,Karadeli U,Coşar E,Uludag A,Ozdemir O.Çanakkale populasyonunda Beta-Globulin gen profilleri,s85,2-4 Aralık 2013,İzmir.

C-3.**Sik E**, Silan F, Uludağ A, Yalçın-tepe S, Urfalı M, Arı E, Özdemir Ö.Çanakkale onsekiz mart üniversitesi tıbbi genetik laboratuvarında saptanan trombofili mutasyonlarının endikasyonlara göre dağılımı. Hematolojik genetik sempozyumu, 2-4 Aralık 2013 İzmir, Bildiri özet Kitabı, s84.

EK. 9**SİRALLİ TEZ KONTROL FORMU**

	Evet	Hayır
1) Amblem renkli ve 2x2 cm boyutunda olmalıdır.	X	
2) Kapakta sadece başlık bold ve 14 punto, diğer yazılar normal renkte ve 12 punto yazılmalıdır.	X	
3) Tez savunma sınavında kabul edilmiş tezler için, tezin sırtı tez yazım kılavuzuna uygun olarak düzenlenmiş olmalıdır.	X	
4) Kabul edilmiş tez konusu ile tezin baş sayfasındaki tez konusu aynı olmalıdır.	X	
5) Beyan eksiksiz ve imzalı olarak Tez Yazım Kılavuzundaki gibi konmalıdır.	X	
6) Özet ve Summary 250'şer kelimeyi aşmamalıdır. (1 sayfa)	X	
7) Anahtar kelimeler (en fazla) 5 adet olmalıdır.	X	
8) İngilizce özetin başında konu başlığı yazılmalıdır.	X	
9) Metin ve kaynakların tümü 1,5 aralıklı olmalıdır.	X	
10) Tezde yazım karakteri olarak "Times New Roman" kullanılmalıdır.	X	
11) Web sayfa kaynakları metin içinde de geçmelidir (parantez içinde güncelleme tarihi ile birlikte). Kaynaklar bölümünde de cümlenin en sonunda Erişim adresi ve Erişim tarihi sırasıyla verilmelidir.	X	
12) Çalışmanın Etik Kurul onayı, varsa kurum onayı tezin en arkasına konmalıdır.	X	

Tarih: 18 / 06 / 2014	Tarih: 18 / 06 / 2014
Öğrenci Ebru ŞİK	Danışmanın Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR

EK. 10**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ SİRALLI/CİTLİ TEZ YAZIM KONTROL
LİSTESİ**

KONTROL BAŞLIĞI	ÖĞRENCİ	DANIŞMAN
Tez yazımında kullanılan yazı tipi	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sayfa kenar boşlukları	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kapak sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İç kapak sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Onay sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Beyan sayfası içeriği ve düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İçindekiler sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Teşekkür sayfası	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Türkçe özet	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İngilizce özet	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Simgeler ve kısaltmalar dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Şekiller dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tablolar dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin ön sayfalarının sıralaması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Ön sayfaların numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sayfalarının numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Başlıklarının numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Şekil, resim ve tablo numaralandırması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Yöntem ve Gereç	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Bulgular	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tartışma	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sonuç ve Öneriler	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kaynaklar	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Atıflar (alıntı ve göndermeler)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Ekler (etik kurul onayı, vs)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tez planı	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Dil (anlatım, yazım –imla)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kâğıt ve baskı özelliği	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin son şeklinin elektronik kopyası	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN

Tarih: 18 / 06 / 2014 Öğrenci Ebru ŞİK	Tarih: 18 / 06 / 2014 Danışmanın Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR
--	--



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : KLİ.ARŞ.ETİK.KURUL.BŞK./050.99-19
Konu : Başvuru İncelemesi

23/01/2014

Sayın Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "Kolorektal Kansere Epigenetik Yaklaşım; APC Tumor Supressör Gen Fonksiyon Analizleri" başlıklı EK-2014-01 nolu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 22/01/2014 tarih ve 02-06 nolu kararı aşağıdadır.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Emine COŞAR
Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Karar Tarihi : 22.01.2014 15:30
Karar No : 2014-02

Karar-06) EK-2014-01 no'lu araştırma ile ilgili olarak, proje araştırmacılarından Ebru ŞİK'in sunumunun dinlenmesinin ve raportörün hazırladığı değerlendirilmenin okunması sonrasında yapılan oylamada "ETİK KURUL ONAYINI ALIR." kararı verilmiştir. (Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR projede yer aldığından ve Doç. Dr. Coşkun SILAN projede yer alan Prof. Dr. Fatma SILAN'ın eşi olduğundan dolayı bu araştırma önerisi için oy kullanmamışlardır.)