

**KOLON KANSERİ TANILI OLGULARDA
MS-MLPA METODU İLE
MMR (MISMATCH REPAIR=HATALI EŞLEŞME TAMİRİ)
GENLERİNDE METİLASYON SIKLIĞININ SAPTANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İbrahim ÇEKEN

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Serap TUTGUN ONRAT**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
EYLÜL 2009**

“Bu tez çalışması 07.FENED.15 numaralı proje olarak A.K.Ü BAPK tarafından desteklenmiştir.”

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOLON KANSERİ TANILI OLGULARDA MS-MLPA
METODU İLE MMR (MISMATCH REPAIR= HATALI EŞLEŞME TAMİRİ)
GENLERİNDE METİLASYON SIKLIĞININ SAPTANMASI**

İbrahim ÇEKEN

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Serap TUTGUN ONRAT

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AFYONKARAHİSAR

2009

ONAY SAYFASI

Yard.Doç.Dr.Serap TUTGUN ONRAT'ın danışmanlığında,
İbrahim Çeken tarafından hazırlanan
**“KOLON KANSERİ TANILI OLGULARDA MS-MLPA METODU İLE MMR
(MISMATCH REPAIR=HATALI EŞLEŞME TAMIRI) GENLERİNDE
METİLASYON SIKLIĞININ SAPTANMASI”**

başlıklı bu çalışma, lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca

... / ... /

tarihinde aşağıdaki jüri tarafından

Moleküler Biyoloji Anabilim dalında

Yüksek lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı, Soyadı

İmza

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Cevdet UĞUZ
(Başkan)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Serap TUTGUN ONRAT
(Danışman)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sait BULUT

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Rıdvan Ünal
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KOLON KANSERİ TANILI OLGULARDA MS-MLPA METODU İLE MMR(MISMATCH REPAIR=HATALI EŞLEŞME TAMİRİ) GENLERİNDE METİLASYON SIKLIĞININ SAPTANMASI

İbrahim ÇEKEN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Canlı organizmaların genomdaki fonksiyon kayıplarına genlerdeki çeşitli sayısal ve yapısal aberrasyonlar sebep olduğu gibi, genomda herhangi bir anormal değişiklik olmadan çevresel veya genetik şartlara bağlı olarak oluşabilen DNA metilasyonu gibi epigenetik faktörler de sebep olabilmektedir.

Hatalı-eşleşme tamir mekanizması, çeşitli sebeplerle DNA üzerindeki birbirinin komplementeri olmayan bazların eşleşmesi halinde, hatalı eşleşen bazları tanımakta ve doğru bazı yerleştirmektedir. MLH1, MSH2, MSH6, MSH3, MLH3, PMS2, MGMT genleri hatalı-eşleşme tamir mekanizmasında görev almaktadır.

Çalışmamızda parafine gömülü kolorektal kanser tanılı doku örnekleri kullanıldı. Toplam 70 adet örnek ile çalışıldı. Örneklerimiz 41 adet erkek (% 58,6) ve 29 adet kadın (% 41,4) olgulardan oluşmaktadır. Erkek örneklerin yaş ortalaması % 55,02, kadın örneklerin yaş ortalaması % 61,76 olarak tesbit edilmiştir. Örneklerin 49 adeti (% 70,0) adenokarsinom tanılı, 21 adeti (% 30,0) karsinom tanılı olgulardan oluşmaktadır.

Multipleks ligasyon esaslı prob amplifikasyonu (MLPA) tek reaksiyonda aynı veya farklı genlere ait birden fazla hedef bölgelerinin amplifikasyonunu yapabilmektedir. Bu gen bölgelerinin metil-duyarlı kesim enzimi reaksiyonuna bağlı olarak metilasyon durumu ile ilgili bilgi verebilmektedir. Bu kesim reaksiyonu için HhaI restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılmaktadır.

Çalışmamızda MS-MLPA (Metilasyon Spesifik Multipleks Ligasyon Esaslı Prob Amplifikasyonu) yöntemi kullanılmıştır. 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, bu işlem sonucunda hedef bölgenin amplifiye olup olmamasına bağlı olarak ilgili gen bölgesinin metilasyon durumunu saptanabilmektedir.

Yaptığımız çalışmada kolon kanser tanılı olgulardaki hatalı eşleşme tamirinde görev yapan genlerin CpG bölgelerinde metilasyon sıklığı tesbit edildi. Elde edilen sonuçlar DNA tamirinde görev alan genlerde meydana gelen metilasyonun kolorektal karsinogenesisize sebep olan faktörlerin arasında yer aldığı konusunda önemli bir fikir verdi.

Metilasyon duyarlı enzim kesim bölgesi içeren MLH1, MSH2, MSH6, MSH3, MLH3, PMS2, MGMT genlerine ait toplam 21 adet özgül hedef bölgenin prob amplifikasyonu yapıldı. Bu amplifikasyon sonuçlarına göre metilasyon oranları ortalama MLH1 (% 97.14), MSH2 (% 24.28), MSH6 (% 67.14), MSH3 (% 78.57), MLH3 (%75.71), PMS2 (% 65.71), MGMT (% 82.85) olarak saptandı.

Hatalı-eşleşme tamirinde sorumlu olan genlerde gözlenen bu metilasyon oranları kolorektal karsinogenesisiz açısından oldukça anlamlı bulduk. Özellikle en yüksek metilasyon oranı bütün kolorektal kanser tiplerinde fonksiyon kaybına en sık rastlanan MLH1 geninde gözlendi ki, bu durum çalışmamızla literatür arasında paralellik göstermektedir.

2009, 99 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kanser, Kolon Kanseri, Hatalı-Eşleşme Tamir Genleri, DNA Metilasyonu, MS-MLPA (Metilasyon Spesifik Multipleks Ligasyon Esaslı Prob Amplifikasyonu)

ABSTRACT

Ms.Sc.Thesis

DETECTION OF METHYLATION PATTERN AT MMR(MISMATCH REPAIR) GENES BY MS-MLPA METHOD IN CASES OF COLON CANCER

İbrahim ÇEKEN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Institute for the Natural and Applied Sciences

Loss of function in genes in the genome of living organisms to cause various numerical and structural aberrations. As the genome without any abnormal changes can occur depending on environmental or genetic conditions, such as DNA methylation in epigenetics factors may cause.

Mismatch repair mechanism, for various reasons, on DNA base pairing of non-complementary to each other in case of mismatched bases are recognized and correct some puts. MLH1, MSH2, MSH6, MSH3, MLH3, PMS2, MGMT genes are also involved in mismatch repair mechanisms.

In our study with a diagnosis of colorectal cancer tissue samples embedded in paraffin were used. With total 70 samples were studied. Example of 41 men (58.6%) and 29 units women (41.4%) patients consists of. The mean age of 55.02% male sample, women's average age of the samples was determined as 61.76%. Total of 49 samples (70.0%) with a diagnosis of adenocarcinoma, 21 total (30.0%) consists of patients with carcinoma.

Multiplex ligation probe-based amplifikasyonu (MLPA) in a single reaction to the same or different genes may be more than one target regions amplification. Methyl-sensitive segments of this gene region, depending on the enzyme reaction is able to provide information about the status of methylation. This part of the enzyme reaction is used for the HhaI restriction endonuclease.

In our study, MS-MLPA (Multiplex ligation Metilayon Specific Probes Based Ampklifikasyonu) method was used. With this method, a single reaction many target region can be amplified. The target area also includes series of CpG methylation according to the state sector through the enzyme HhaI cutting process are being realized, as a result of this process the target area, depending on whether the amplified region methylation status of the gene can be detected.

We study in patients with a diagnosis of colon cancer who served in mismatched repair gene methylation frequency was detected in the region of the CpG. The results obtained in genes involved in DNA repair occurring between methylation of the factors that cause colorectal carcinogenesis where the subject has an important idea.

Methylation-sensitive enzyme cutting region containing MLH1, MSH2, MSH6, MSH3, MLH3, PMS2, MGMT gene belonging to a total of 21 units of the specific target region probe amplification was performed. According to the results of this amplification mean MLH1 methylation rates (97.14%), MSH2 (24.28), MSH6 (67.14%), MSH3 (% 78.57), MLH3 (75.71), PMS2 (65.71%), MGMT (% 82.85) were found to be.

The genes responsible for repairing mismatch methylation rates observed in this very meaningful in terms of colorectal carcinogenesis found. In particular the highest rate of methylation in the loss of function in all types of colorectal cancer most common in the MLH1 gene was observed that this case study suggests parallels between our literature.

2009, 99 pages

Key Words : Cancer, Colorectal Cancer, Mismatch Repair Genes, DNA Methylation, MS-MLPA (Methylation Specific Multiplex Ligation Dependent Prob Amplification)

TEŐEKKÜR

Bu tezin hazırlanması sürecinde bana yol gösteren, fikirleri ile bana yeni kazanımlar sağlayan ve kendimi geliőtirmemde önemli bir rol oynayan saygıdeğer danışman hocam Yrd.Doç.Dr.Serap TUTGUN ONRAT'a, çalışma süresince laboratuvar ve diğer imkanlarını kullandığım Diagen A.Ő.'ye, Genetiks Genetik Tanı Merkezine, her zaman maddi manevi desteğiyle yanımda olan eşim ve aileme teőekkürlerimi sunarım.

İbrahim ÇEKEN

AFYONKARAHİSAR, Eylül 2009

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. KANSER.....	4
2.1.1. Kanser Tanımı	5
2.1.2. Kontak İnhibisyon.....	6
2.1.3. Neoplazi (Neoplazm)	7
2.1.4. Tümör.....	7
2.1.4.1. Benign Tümör	8
2.1.4.2. Malign Tümör	8
2.1.5. Kanserde Predispozan Faktörler	9
2.1.6. Kanser Hücreleri ve İmmünolojik Cevap.....	10
2.1.7. Virüsler ve Onkogenez.....	12
2.1.8. Epigenetik.....	13
2.1.8.1.Epigenetik Mekanizmalarla Sessizleştirilen Genler	15
2.1.8.2. Histon modifikasyonları	15
2.1.8.3.DNA Metilasyonu	17
2.1.8.4. DNA Metilasyonu ile Gen İfadesinin Düzenlenmesi.....	18
2.1.8.5. DNA Metilasyonunun Görev Aldığı Olaylar	20
2.2. KOLON KANSERİ.....	22
2.2.1. Kolon Kanserinde TNM Derecelendirme Sistemi.....	24
2.2.2. Kolon Kanserinde Evre Gruplaması	25
2.3. DNA TAMİR MEKANİZMALARİ	27

2.3.1. Hatalı-Eşleşme Onarımı (Mismatch Repair).....	29
2.3.1.1. MLH1 Geni.....	30
2.3.1.2. MSH2 Geni.....	31
2.3.1.3. MSH6 Geni.....	32
2.3.1.4. MLH3 Geni.....	32
2.3.1.5. PMS2 Geni.....	33
2.3.1.6. MSH3 Geni.....	33
2.3.1.7. MGMT Geni	34
2.3.2. Kalıtsal Kolon Kanseri ve DNA Tamir Bozuklukları.....	35
2.4. MULTİPLEKS LİGASYON ESASLI PROB AMPLİFİKASYONU (MLPA)	36
2.4.1. MS-MLPA Tekniği.....	37
2.4.2. MLPA' nın Avantajları	42
3. MATERYAL ve METOD	45
3.1. MATERYAL.....	45
3.1.1. Çalışılacak Doku Örneklerinin Temini	45
3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar	45
3.1.3. Dokulardan Parafinini Uzaklaştırılmasında Kullanılan Solüsyonlar	49
3.1.4. MLPA yöntemi için kullanılan solüsyonlar	49
3.1.5. BstHH I (Hha I) Restriksiyon Endonükleaz.....	49
3.1.6. MLPA ME011 Kit Problemleri ve Özellikleri.....	50
3.2. METOD	52
3.2.1. Dokuların Hazırlanması	52
3.2.2. Parafinin Uzaklaştırılması	53
3.2.3. DNA Ekstraksiyonu	55
3.2.4. MLPA Reaksiyonları	56
3.2.4.1. Hibridizasyon.....	56
3.2.4.2. Ligasyon , Ligasyon+Kesim	56
3.2.4.3. PCR	57
3.2.4.4. Kapiler Elektroferez ile Yürütme	58
3.2.5. İstatistiki Değerlendirme Metodu	58
4. BULGULAR.....	59

4.1. İzole Edilen Doku DNA' larının Spektrofotometre İle Ölçüm Değerleri	59
4.2. PCR Ürünlerinin Kapiller Elektroforez Sonuçları	61
4.3. Cinsiyet Yönünden MMR genlerinin Metilasyon Bulguları.....	68
4.4. Yaş Yönünden MMR genlerinin Metilasyon Bulguları	72
4.5. Kanser Olgusunun Tanı Yönünden MMR genlerinin Metilasyon Bulguları.....	75
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	81
5.1. Parafin Bloktan DNA İzolasyonundaki Sorunlar	81
5.2. MMR (Mismatch Repair) Genlerin MLPA metodu ile analizi	82
6. KAYNAKLAR.....	90
6.1. İnternet Kaynakları	98
7. ÖZGEÇMİŞ.....	99

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
APC	: Adenomatous Polyposis Coli (Adenomatöz Polipozis Koli)
APC geni	: Adenomatöz Polipozis Coli Geni
AS	: Angelman sendromu
C	: Cytosine (Sitozin)
CpG	: Cytosine Fosfo Guanin
CRC	: Colorectal Cancer (Kolorektal Kanser)
DCC	: Deleted in Colorectal Cancer (Kolorektal Kanserde Silinmiş)
DCC geni	: Deleted Colorectal Carcinoma Geni
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNMT	: DNA Metil Transferaz
FAP	: Familial Adenomatous Polyposis (Ailesel Adenomatöz Polipozis Koli)
G	: Guanin
HAT	: Histon Asetilaz
HDAC	: Histon De Asetilaz
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
LOH	: Loss of Heterozygosity (Heterozigosite Kaybı)
MLH2	: MutL Homolog 1
MMR genes	: Hatalı Eşleşme Tamir genleri (Mismatch Repair Genes)
MSH2	: Mut S Homolog
MSI	: Microsatellit Instability (Mikrosatellit Düzensizlik)
MS-PCR	: Metilasyon Spesifik PCR
MS-MLPA	: Metilasyon Spesifik Multipleks Ligasyon Esaslı Prob Amplifikasyonu
mRNA	: Messenger RNA (Haberci RNA)
NER	: Nukleotide Excision Repair (Nükleotit Kesip Çıkarma Tamiri)
PCR	: Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PMS1	: Postmeiotic Segregation Increased 1 (Mayoz Sonrası Ayrım Artışı1)

PMS2	: Postmeiotic Segregation Increased 2 (Mayoz Sonrası Ayrım Artışı 2)
PWS	: Prader Willi Sendromu
RE	: Restrüksiyon Endonükleaz
RER	: Replication Error (Replikasyon Hatası)
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferans
SAM ve Ado- Met:	S-Adenozil Metionin
TSG	: Tümör Süpressör Gen

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Genetik ve Epigenetiğin şematik gösterimi, genotip, nükleotidlerin yan yana dizilişiliyle oluşmakta, epigenotip ise bu dizilişe anlam ve değişik ifade biçimleri kazandırmaktadır	13
Şekil 2.2. Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu. HAT: Histon asetil transferaz, HDAC: Histon deasetilaz	16
Şekil 2.3. Genler kromozomların kısa ve uzun kollarına yerleşmiştir (Roche 2005).....	16
Şekil 2.4. DNA metilasyonunun mekanizması. SAM bir metal donörüdür. DNMT enzimi metilasyondaki katalizördür.	17
Şekil 2.5. Karşılıklı zincirlerin C(Sitozin) bazı üzerinden metillenmesi.	19
Şekil 2.6. DNA metilasyonu ve kanser	20
Şekil 2.7. DNA zincirinde bazlar belirli bir düze içerisinde dizilir	27
Şekil 2.8. Genler kromozomların kısa ve uzun kollarına yerleşmiştir	29
Şekil 2.9. Tek baz hataları ile birden fazla baz hatalarında MMR proteinlerin etkileşim mekanizması değişmektedir.	31
Şekil 2.10. Hatalı-eşleşme tamirinde görev alan genlerin çalışma mekanizması.....	34
Şekil 2.11. MLPA prob dizaynı	36
Şekil 2.12. BRCA1 MLPA kiti ile analiz edilen ekzon 13' de bir delezyon ile karakterize DNA örneği.	37
Şekil 2.13. MLPA problemlerinin hedef bölgelerinde hibride olması ve ligasyonu	39
Şekil 2.14. MLPA yöntemi ile metilasyon durumunun belirlenmesini sağlayan tekniğin basamakları	40
Şekil 2.15. MLPA ile metilasyon durumunun görsel olarak belirlenmesi	41
Şekil 2.16. Fragman analizi sonucu ortaya çıkan pik görüntüleri ile görsel olarak değişiklikler tespit edilebilir. Ayrıca elde edilen size ve area değerleri kullanılarak çeşitli analiz programları ile doğrulaması yapılabilir	43
Şekil 3.1. HhaI enziminin tanıma bölgesi CG dizisidir. Bu dizisi genellikle genomda CpG adacıklarında lokalizedir.	50
Şekil 4.1. Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz kontrol grubu ve örneklerimize ait PMS2, MSH6, MLH1, MSH2, MGMT, MSH3, MLH3 genine ait pik görüntüleri.	79

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

- Resim 2.1. Komşu hücrelere göre morfolojik farklılık oluşturan bir kanser hücresi..... 6
- Resim 2.2. Kalın barsakda kolonoskopi ile tespit edilen perifer dokulara göre morfolojik farklılık gösteren kanser dokusu..... 6

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Kanser Olgularının Kadın ve Erkeklerde Yaş Gruplarına Göre Dağılımı.....	5
Çizelge 2.2. Doku ve hücrelerdeki meydana gelen sayısal ve yapısal değişikliklere bağlı özellikler.....	7
Çizelge 2.3. Bazı Tümör Tiplerinin En Sık Metastaz Yaptıkları Alanlar	8
Çizelge 2.4. Selim Ve Habis Tümörler Arasındaki Temel Farklar.....	9
Çizelge 2.5. Erken Teşhis Çalışmalarında Hastalarda Ölçülen Bazı Tümör Belirteçleri.....	10
Çizelge 2.6. Kanser Oluşumunda Rol Oynayan Predispozan Faktörler.....	11
Çizelge 2.7. Tümörün Sebep Olduğu Bazı Semptomlar	11
Çizelge 2.8. Onkogenik virüslerin sınıflandırılması ve ilişkili olduğu kanser tipleri	12
Çizelge 2.9. Epigenetik mekanizmalar	14
Çizelge 2.10. Kanserlerin çeşitlerini erkeklerde ve kadınlarda görülme sıklığı.....	22
Çizelge 2.11. Kanserden ölümler erkeklerde ve kadınlarda kanser çeşidine göre değişmektedir	23
Çizelge 3.1. Çalışılan olgulara ait patolojik veriler.....	47
Çizelge 3.2. Devamı, Çalışılan olgulara ait patolojik veriler	48
Çizelge 3.3. Hedef gen bölgelerine hibride olan sentetik MLPA problemleri ve özellikleri.....	51
Çizelge 4.1. DNA izolasyonu sonucu elde edilen absorban değerleri (260/280 nm).....	60
Çizelge 4.2. Kontrol grubunda genlere göre metilasyon oranları	63
Çizelge 4.3. Kontrol grubunda ve çalışma grubundaki genlere göre eşik değeri olarak belirlenen ortalama metilasyon oranları.....	64
Çizelge 4.4. Metilasyon gözlenen genlerin olgulara göre dağılımı	65
Çizelge 4.5. Devamı, Metilasyon gözlenen genlerin olgulara göre dağılımı	66
Çizelge 4.6. Cinsiyet, yaş ve tanıya göre yaş verilerinin dağılımı ve karşılaştırılması.....	67
Çizelge 4.7. Metilasyona göre yaş verilerinin dağılımı.....	67
Çizelge 4.8. Tanıya göre cinsiyet ve yaş gruplarının yüzdeleri	68
Çizelge 4.9. Erkeklerde metilasyon yüzdeleri	69
Çizelge 4.10. Kadınlarda metilasyon yüzdeleri	70
Çizelge 4.11. Cinsiyete göre metilasyon yüzdeleri.....	71
Çizelge 4.12. Yaşa göre metilasyon yüzdeleri (60 yaş ve altı).....	72
Çizelge 4.13. Yaşa göre metilasyon yüzdeleri (60 yaş üstü).....	73
Çizelge 4.14. Yaşa göre metilasyon yüzdeleri (60 yaş ve altı).....	73

Çizelge 4.15. Yaşa göre metilasyon yüzdeleri (60 yaş üstü).....	74
Çizelge 4.16. Yaş gruplarına göre metilasyon yüzdeleri.....	75
Çizelge 4.17. Adenokarsinomlu olgularda metilasyon yüzdeleri	76
Çizelge 4.18. Adenomlu olgularda metilasyon yüzdeleri	77
Çizelge 4.19. Tanıya göre metilasyon yüzdeleri.....	78

1. GİRİŞ

Ölüme en sık neden olan hastalıklar arasında kanser vakaları görülmektedir. Bazı kanser türlerinin tanı ve tedavisindeki son yıllardaki ilerlemelere karşın, kanserin erken tanı ve tedavisi halen önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Kanser hastalarının önemli kısmında kanser tanısı hastalığın ileri derecelerinde ya da kanser hücreleri metastaz yapmaya başladıktan sonra gerçekleşmektedir. Bu seviyeye gelindiğinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavi yöntemlerinin sınırlı etki gösterebildiği görülmektedir. Bu durum mortalitenin yüksek olmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu nedenle hastalığın erken belirlenmesine olanak sağlayacak yeni gelişmeler ve teknikler kanser mortalitesini olumlu yönde etkileyecektir.

Kanserli hücrelerde ortaya çıkan mutasyonlar rastgele olmayıp, kendine özgü belirli bir süreç ile ilerlemektedir. Genellikle DNA tamir mekanizmalarında, hücre çoğalmasında, hücre farklılaşması ve kotrollü hücre ölümünde önemli fonksiyonlara sahip genlerdeki değişikliklerle ortaya çıkmaktadır. Genetik değişiklikler sonucu ortaya çıkan fenotipik değişimlerin incelenmesi ve teşhis edilmesi tümör biyolojisinin ve patolojinin araştırma alanına girmektedir. (Öztürk 1998).

Moleküler Biyoloji ve Moleküler Onkoloji alanındaki temel bilim ağırlıklı araştırmaların birçoğunun klinik amaçlı uygulamara dönüştürülmesi amaçlanmaktadır. Bu sebeple, klinik tedavi yaklaşımları giderek moleküler biyoloji ve moleküler onkoloji bilimine daha bağımlı hale geleceği tahmin öngörülmektedir. Prediktif (kestirimci) tıp alanında kansere yatkın bireylerin tesbit edilmesi, kanser tedavisinde klasik yöntemlerin etkin olarak yürütülmesi, ayrıca yeni yöntemlerin denenmesi için iyi bir klinik laboratuvar işbirliği gerekmektedir (Öztürk 1998).

Kalın bağırsak (kolorektal kanserler) özellikle gelişmiş batı ülkelerinde önemli bir sağlık sorunu olarak görülmektedir. A.B.D., Kanada, İngiltere, Fransa, Almanya gibi ülkelerde toplumda görülme sıklığı yüzbinde 40-60 arasındadır. Yaklaşık olarak yılda A.B.D.'de 150.000, Avrupa'da 170.000, tüm dünyada ise yaklaşık olarak yılda bir milyon yeni vaka görülmektedir. Tüm yaşam sürecinde toplumda her 50 kişiden birinde

kolorektal kanser görülmektedir. A.B.D.'de kolorektal kanserin tüm yeni kanser vakaları arasında görülme sıklığı erkekte ve kadında % 11 oranı ile üçüncü sırada yer almaktadır (Giovannucci et al 1994).

Kolorektal kanserin moleküler ve biyolojik özellikleri ile ilgili artması bilgilerin hızla artması kolorektal patogeneze ışık tutmaktadır. Çünkü bu kanserler genetik altyapı ve çevresel faktörlerin ortak etkileşimi sonucu belirli bir süreç sonucunda ortaya çıkmaktadır. Kolorektal patogenezindeki bilgilerin hızlanarak artmasına bağlı olarak, potansiyel küratif cerrahinin ardından alternatif tedaviden en fazla yararlanacak bireyleri tesbit etmede yeni yaklaşımların oluşmasına yol açabilecektir. Ayrıca neoplastik ve neoplastik lezyonların erken tetkik hızını artırabilecektir (Bresalier 2004).

Hücre bölünmesini düzenleyen genlerin (onkogenler ve tümör baskılayıcı genler) bozulmaları ya da fonksiyon kayıpları durumlarında insan kanserleri oluşmaktadır. Hücreler kontrol dışı çoğalmaya başlamakta ve tümörleri oluşturmaktadır. Hücre bölünmesini kontrol eden genlerin, bir tümör virüsü tarafından işgal edilmesiyle ya da kendiliğinden oluşan mutasyonların etkisiyle başlayabilmektedir. Mutasyonların oluşum hızındaki artışa bağlı olarak insan kanserlerinin gelişme süreci de hızlanmaktadır (Kılıç 2005).

Mutasyon meydana gelme hızındaki artma sebebiyle, DNA tamir oluşan değişikliklerin neticesinde bireyin kansere yatkınlığı artar. Nükleotit kesip çıkarma tamiri, baz kesip çıkarma tamiri, hatalı-eşleşme tamiri ve rekombinasyon tamirine katılan proteinleri şifreleyen genlerdeki bozulmalarla insan kanseri arasında yakın bir ilişki vardır. DNA tamir mekanizmaları hücre için fevkalade önemlidir (Kılıç 2005).

Prokaryot ve ökaryot canlılar, DNA'larının bütünlüğünü için çeşitli DNA tamir mekanizmalarına sahiptir. Memeli hücrelerinde çeşitli tip ve özelliklere sahip DNA hasarlarının onarımı için, farklı işlevsel özelliklere sahip DNA tamir yolları ile onarım mekanizmaları gerçekleştirilmektedir (Boer et al 2000).

Metilasyonun gen ifadesinin düzenlenmesinde bir faktör olduğunun gösterilmesi bazı gözlemlere dayanmaktadır. Bir gendeki metilasyon sıklığı ile o genin ifade edilme

(ekspresyonu) derecesi 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 et al 2001).

Bu çalışmamızda epigenetik değişikliklerden biri olan ve gen ekspresyonunda önemli rolü olan DNA metilasyonun kanserleşme üzerindeki sonuçları araştırıldı. Çeşitli ekzojenik ve endojenik faktörlere bağlı olarak DNA molekülü üzerinde meydana gelen hatalar ve bozulmaların tamirinde görev alan çeşitli DNA tamir genleri genomik stabilitenin korunmasını sağlamaktadır. Ayrıca bu genler işlevleri nedeniyle tümör süpresör genleri gibi çalışmaktadır.

Bu çalışma parafine gömülü kalın bağırsak doku rezeksiyonları ile yapıldı. Bu doku örnekleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarının ve özel bir laboratuvarın patoloji arşivlerinden temin edildi. Kalın bağırsağın rektum, çekum, sigmoid, sağ kolon, sol kolon ve tranvers kolon bölgelerinden adenokarsinom ve adenomlu doku rezeksiyonları ile çalışmalar gerçekleştirildi.

Çalışmamızda DNA tamir mekanizmalarından, hatalı eşleşme tamir mekanizmasında rol oynayan MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS2 ile MGMT genlerine ait hedef bölgelerin metilasyon sıklığı incelendi.

Hatalı eşleşme tamirinden sorumlu genlerin metilasyon durumunun belirlenmesinde Multipleks Ligasyon Esaslı Prob Amplifikasyonu (MLPA) yöntemi kullanıldı. Bu yöntem ile MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS2 ile MGMT genlerine ait spesifik problemlerin tek reaksiyonda multipleks amplifikasyonu yapıldı. Elde edilen ampliconların sekans cihazı ile fragman analizi yapıldı ve metilasyon durumları incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Moleküler Genetik alanındaki çalışmalar, kanserdeki genetik faktörlerin önemini göstermiştir. Genetik hastalıklardan farklı olarak kanserin klinik olarak ortaya çıkabilmesi için birden fazla gende mutasyonların oluşması ya da bazı kanser türlerindeki gibi viral genlerin kanserli hücrelerde ifade edilmeleri gerekmektedir. Aynı zamanda kanserin büyüme ve gelişimi, başka dokulara invazyonu, kemoterapötik ajanlara ve radyasyon tedavisine direnç kazanması da genetik mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Bazen kanseri tetikleyen genetik mutasyonlar kalıtsal olarak ana-babadan çocuklara geçebilir. Ailesel meme ve kolon kanserlerindeki gibi kalıtsal mutasyonları taşıyan bireyler toplumdaki diğer bireylere göre daha yüksek kanser riski taşırlar (Öztürk 1998).

Ülkemizdeki ölümler arasında, kansere bağlı ölümlerin oranı 1990 yılında %10,1 iken 1999'da %12,4'e ulaşmıştır ve kalp hastalıklarına bağlı ölümlerden sonra ikinci sırada yer almaktadır (T.C.Başbakanlık 1999). Kanserlerin oluşum sıklığı, türüne, hasta yaş ve cinsiyetine, coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir (Doğu 2007).

Dünyada bir yılda ortaya çıkan 10 milyon yeni olgunun, 5,3 milyonunu (%53) erkekler, 4,7 milyonunu (%47) ise kadınlar oluşturmaktadır. Sayının yıllar içinde artması ve yeni kanser olgularının sayısının 2020 yılında yıllık 20 milyona ulaşması tahmin edilmektedir (Eaton 2003).

Kanserin hücre içindeki gelişimi hemen tamamlanmaz. Kanserli hücreye dönüşmeden önce, o hücrenin genetik bilgisinde pek çok değişiklik olması gerekir. Hücrelerin anormal büyüme süreci adım adım gelişir. Her bir genetik değişiklik, hücreyi anormal büyüme sürecinde biraz daha ileriye taşır. Bütün hücrelerin genetik özellikleri tıpatıp aynı olmadığı için, genetik değişikliklerin ne zaman gerçekleşeceğini tahmin etmek imkansız gibidir. Dolayısıyla bazı kanser tipleri oldukça yavaş bir seyir gösterirken,

bazıları ise hızla ilerleyip bir kaç ayda kişinin sağlığını bozmaktadır. Bir çok kanser türünde, tümör dokusunda belirlenen spesifik onkogenler, tümör baskılayıcı genlerdeki nokta mutasyonları, heterozigotluk kaybı (LOH), mikrosatellit instabilitesi, kromozomal translokasyonlar ve hipermetilasyon gibi moleküler değişiklikler hastaların önemli bir bölümünde serum veya plazmada da bildirilmiştir (Yamada 1998).

2.1.1. Kanser Tanımı

Kanser organizmada meydana gelen ve hücreleri kontrolsüz büyüyen kötü huylu tümörlere verilen genel addır. Kanser, genellikle kontrolden çıkan hücrelerin sürekli çoğalması diğer bir ifadeyle hücre proliferasyonudur. Kanserleşen hücreler, malignant (kötü huylu) tümör özelliği taşırlar, bu tip hücreler benign (iyi huylu) tümörlerin aksine başka dokulara sızma (invazyon) ve yayılma (metastaz) özelliği gösterir.

Karsinogenez çok faktörlü ve çok basamaklı bir olay olup, 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).

Çizelge 2.1. Kanser Olgularının Kadın ve Erkeklerde Yaş Gruplarına Göre Dağılımı (Doğu 2007).

	Cinsiyet					
	Erkek		Kadın		Toplam	
Yaş grubu	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

2.1.2. Kontak İnhibisyon

Kültürde, normal hücreler komşu hücelere yapışarak ilişkilerini devam ettirirler. Bu yapışma (adhezyon) noktalarında hücelerde elektronca yoğun bir plak oluşur. Bununla birlikte, hücelerin ameboid uzantılarında yavaşlama ve durma görülür. Bu olaya kontak inhibisyon denir. Bu şekilde, hücre bölünmesi kontrol edilir. Deneysel olarak, normal hüceler bir kültür ortamında kendilerine sağlanan ortam şartları ne kadar iyi olursa olsun kontak inhibisyon nedeniyle tek tabaka oluşturduktan sonra daha fazla çoğalmazlar. Çünkü, bölünme sınırlı sayıda olur. Fakat, kanser hüceleri sürekli çoğalarak birkaç tabakalı düzensiz kitleler oluştururlar. Bu da kanser hücelerinde kontak inhibisyon kaybı olduğunu göstermektedir (İnt.Kyn.2).



Resim 2.1. Komşu hücelere göre morfolojik farklılık oluşturan bir kanser hücresi (İnt.Kyn.3).



Resim 2.2. Kalın barsakta kolonoskopi ile tespit edilen perifer dokulara göre morfolojik farklılık gösteren kanser dokusu (İnt.Kyn.4).

2.1.3. Neoplazi (Neoplazm)

Yeni büyüme, yeni oluşum anlamı taşır. Büyümesi normal dokuyu aşan onunla koordine olmayan, olayın başlamasına sebep olan uyarı kalktıktan sonra büyümeye devam eden anormal doku kitlesidir. Büyüme amaçsızdır ve otonomi gözlenir.

Çizelge 2.2. Doku ve hücrelerdeki meydana gelen sayısal ve yapısal değişikliklere bağlı özellikler (İnt.Kyn.1).

NEOPLAZİ ÇEŞİTLERİ	ÖZELLİKLERİ
Hiperplazi	Hücrelerin sayılarının artmasıdır, 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, diferansiye hücre olarak da ifade edilir

2.1.4. Tümör

İnflamasyona bağlı şişliği tanımlamak için kullanılmıştır. Genellikle neoplazim ile eş anlamlı kullanılmaktadır. Benign ve malign tüm neoplazmları kapsar.

2.1.4.1. Benign Tümör

Başlangıç bölgeleriyle sınırlı kalan ve yavaş çoğalan hücrelerden oluşan tümörlere benign (iyi huylu) tümör adı verilir. Kistler, siğiller, benler ve polipler benign tümörlerdir. Bunlar vücudun diğer bölgelerine yayılmazlar. Ameliyatla tamamı çıkarıldığında tekrar büyümmezler.

Çizelge 2.3. Bazı Tümör Tiplerinin En Sık Metastaz Yaptıkları Alanlar (İnt.Kyn.1).

PRİMER TÜMÖR	EN SIK METASTAZ YERİ
Meme	Akciğer, kemik
Kolorektal	Karaciğer, periton, over
Prostat	Kemik
Hipernefron	Karaciğer, kemik, akciğer
Tiroid	Kemik, akciğer

2.1.4.2. Malign Tümör

Malign (kötü huylu) tümörler hızla büyüyen anormal hücrelerden oluşur. Kanser terimi malign tümörleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Bu tümörler diğer dokulara yayılarak oradaki normal hücrelerin yaşamını bozup bir çeşit istila yapmak eğilimindedir. Malign hücreler, hızla üremelerini sağlayan özelliklere sahiptirler. Bu hücrelerde genetik stabilite kaybolduğu için anormal protein üretirler. Malign hücreler bu özellikleri sayesinde, mikroskopik olarak diğer hücrelerden ayırt edilebilirler. Bu mikroskopik incelemeyi patoloji bilim dalı yapmaktadır (Franks 1996).

Tümörler parankimal elemanlarına göre isimlendirilir. İsimlendirme köken aldıkları doku, dokunun makroskopik ve mikroskopik görünümü, dokunun diferansiyasyon derecesine göre yapılır. Stroma parankim için çatı ve destek oluşturur. Stroması az olan tümörler yumuşak ve etsi kıvamlıdır. Bol stroması olan tümörler ise serttir. Bazen parankimal hücreler bol kollajenöz stroma yapımını stimüle ederler (Hamilton 2000)

Çizelge 2.4. Selim Ve Habis Tümörler Arasındaki Temel Farklar (İnt. Kyn.1).

	BENİGN=SELİM	MALİGN=HABİS
Farklılaşma- Anaplazi	İyi Diferansiye	Kötü Diferansiye-Anaplazi
Büyüme Hızı	Progresif ve yavaş	Yavaş veya hızlı
Lokal invazyon	İyi sınırlı	İnvaziv, normal dokuyu infiltrate eder
Metastaz	Yoktur	Çoğunlukla vardır

Kanser hastalarının çoğu, kalp hastalığı veya başka enfeksiyonlar gibi kanserle ilgisi olmayan nedenlerden dolayı ölür. Tümörün bulunduğu bölge ve tümörün yayıldığı bölgenin büyüklüğü ölümü direkt veya indirekt olarak etkileyen nedenlerdir. Ölümün temel nedeni, beyin, akciğer, karaciğer gibi hayati önemi büyük olan organlarda tümör oluşması veya tümörün bu organlara yayılmasıdır (Franks 1996).

2.1.5. Kanserde Predispozan Faktörler

Kanserlerin çok büyük çoğunluğu çevresel önlenilme potansiyeli vardır. Kalıtım yoluyla kanser meydana gelme olasılığı çevresel faktörlere oranla çok daha azdır. X-ışınları, UV (ultraviyole-morötesi) ışınları gibi fiziksel etkenler ve bazı ilaçlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi kimyasal faktörlerin yanında virüsler de biyolojik olarak normal karaktere sahip bir hücre kültürünü transforme ederek kanser oluşturabilirler. Kimyasal karsinogenler, tümörü ya uygulandığı yerde örnek olarak cilt veya absorbe edildiği yerde örnek olarak bağırsak ya da metabolizmanın durumuna göre karaciğer, böbrek gibi organlarda, bazen de direkt olarak alakası olmayan bir yerde meydana getirirler. Fakat, karsinogene maruz kalma kanser oluşturmak için tek başına bir sebep değildir. Karsinogenler ancak uygun yer ve zamanda kanser oluşturabilirler (Correa 1978).

Çizelge 2.5. Erken Teşhis Çalışmalarında Hastalarda Ölçülen Bazı Tümör Belirteçleri
(İnt.Kyn.1)

TÜMÖR BELİRTEÇLERİ	
Gastrointestinal kanal	CEA, CA 19-9
Prostat	PSA, PAP
Karaciğer	AFP, CEA
Meme	CEA, CA 15-3
Over	CA 125, PLAP, β -HCG
Trofoblastik hastalıklar	HCG

Hidrokarbonlar, baca temizleyicileri, boya endüstrisinde kullanılan maddeler, aflatoksin (küf mantarı tarafından sentezlenir), nikel, krom, parfümlerde kullanılan bazı kimyasallar, yiyecek katkıları, birçok ilaçlar, sigara (nikotin) başlıca kanser tetikleyici faktörlerdir (İnt.Kyn.5).

2.1.6. Kanser Hücreleri ve İmmünolojik Cevap

Fiziksel faktörlerin, kanserojen kimyasal maddelerin veya onkogenik virüslerin konak hücre genomu ile etkileşimleri sonucu hücreler değişmekte ve farklı antijenite kazanmaktadır. Bir normal hücrenin kontrolden çıkarak hızla bölünmesiyle oluşan kanserli hücrede birçok anormal doku antijeni belirmektedir. Tümör hücrelerinde yeni yeni antijenler oluşmakta ve normal antijenlerin kaybına veya değişikliğine neden olabilmektedir. Erken fetal dönemde doğal olarak mevcut olan protoonkogenlerin farklılaşmasıyla anormal genler oluşmakta ve bunlara hücrel onkogenler adı verilmektedir (Hamilton 2000). Bu farklı hücrelerin temizlenmesinde hücrel immün cevap mekanizması rol oynamaktadır. Buna, immün sistemin kansere karşı immün denetimi denmektedir. İmmün sistem, tümör oluşumunu denetlemekte, aynı zamanda tümör hücresi ve antijenlerine karşı immün cevap çıkarmaktadır. Hücrel immün cevap baskılandığı zaman kanser oluşumu artmaktadır (Kalble 1990).

Çizelge 2.6. Kanserin Oluşumunda Rol Oynayan Predispozan Faktörler (İnt.Kyn.1).

GELİŞMİŞ ÜLKELERDE KANSER MORTALİTESİ NEDENLERİ	
Tütün % 30	Çevre kirliliği % 2
Diet ve şişmanlık % 30	Genler % 2
Perinatal etkiler % 5	Radyasyon % 2
İnfeksiyonlar % 5	Üreme faktörleri % 2
Meslek faktörleri % 5	Yiyecek katkıları % 1
Alkol % 3	Medikal ürünler ve işlemler % 1
Sedanter yaşam % 3	

Yenidoğan ve yaşlılık dönemlerinde immün cevap mekanizması zayıflamaktadır. Yaşlılarda prostat kanseri, çocuklarda nöroblastoma sık görülmektedir. İmmün sistemi baskılayıcı ilaç kullananlarda tümör oluşumu riski artmaktadır. İmmün sistem bozukluğu olan hastalarda da bazı kanser tipleri gelişebilmektedir (Richardson 2002).

Çizelge 2.7. Tümörün Sebep Olduğu Bazı Semptomlar (İnt.Kyn.1).

TÜMÖRÜN ETKİLERİ
Lokalizasyonu ve çevre dokulara baskısı
Fonksiyonel aktivitesi(hormon sentezi vb.)
Kanama ve infeksiyon
Rüptür ve tümör enfartüsü nedeniyle gelişen akut olaylar
Kaşeksi
Paraneoplastik sendromlar

Son yıllarda bazı kanserlere duyarlı genler tespit edilmiştir. Bu genlerin çoğunun belirli organlarda kansere neden olduğu görülmüştür. BRCA1 ve BRCA2 genleri meme ve over kanserlerine, APC, MSH2 VE MLH1 genleri de barsak kanserine duyarlıdır. Bu genlerin, mutant kopyalarını taşıyan insanlarda bazı kanser tipleri topluma oranla daha sık gözlenir (Redston 2004).

2.1.7. Virüsler ve Onkogenez

Virüsler tarafından oluşturulan transformasyon, hücrenin viral genler tarafından kontrolü sonunda ortaya çıkan ve hücrenin biyolojik fonksiyonlarında değişikliklere neden olan bir süreçtir. Burada en sık rastlanan mekanizma viral genomun hücre kromozomuna entegrasyonudur. Viral genomda, transformasyon ve tümör oluşumuna neden olan genlere onkogen (*v-onc*) adı verilir. Viral onkogenler ilk kez retrovirüslerde saptanmıştır. Ancak bu onkogenlerin homolog kopyaları tüm normal hücrelerde (proto-onkogen, *c-onc*) de bulunmuş ve hücre büyüme gelişmesinde rolü olan bu genlerin eksprese edilmediği ya da düşük düzeylerde eksprese edildiği belirlenmiştir. *c-onc*'lar kendilerinin karşılığı olan *v-onc*'lardan farklıdır. Bunun nedeni, virüsün hücre büyümesini farklılaşmasını kontrol eden bir geni hücreden aldıktan sonra mutasyonlar sonucu değişime uğratmasıdır. Virüsler, ya kendileri bir onkogen taşımak ya da hücrenel bir proto-onkogeni aktive etmek suretiyle onkogenezde rol almaktadırlar (Gryfe 1997).

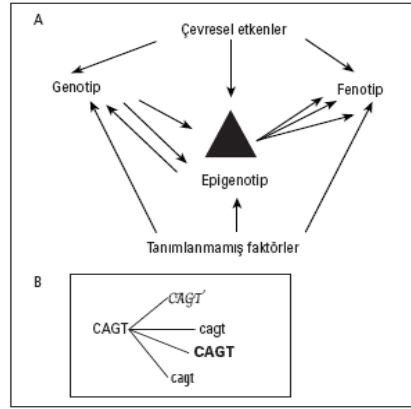
Çizelge 2.8. Onkojenik virüslerin sınıflandırılması ve ilişkili olduğu kanser tipleri (İnt. Kyn.1).

DNA TÜMÖR VİRÜSLERİ	İLİŞKİLİ OLDUĞU KANSER TİPİ
Adeno virüsler (Grup A, en riskli tipler; tip 12, 18, 31)	Değişik solid tümörler (hayvanda)
Hepadna virüsler (Hepatit B virüsü)	Hepatoselüler karsinoma
Herpes virüsler (HSV-2, EBV, HHV-8)	Lenfoma, karsinoma, sarkoma
Papilloma virüsler	Papilloma, karsinoma
Polyoma virüsler	Değişik solid tümörler
Poks virüsler	Miksoma, fibroma (hayvanda)
RNA TÜMÖR VİRÜSLERİ	İLİŞKİLİ OLDUĞU KANSER TİPİ
Retrovirüsler	Hematopietik kanserler, sarkoma, karsinoma
Flavivirüsler (Hepatit C virusu)	Hepatoselüler karsinoma

2.1.8. Epigenetik

Epigenetik terimi ilk kez 1942 yılında Conrad Waddington tarafından genler arası etkileşimde çevresel faktörlerin fenotipte kendini göstermesi olarak kullanılmıştır. Gen ekspresyonuna dayanan kalıtsal bilgi epigenetik olarak sınıflandırılır. Bu, genetik bilginin aksine gen dizisi ile ilişkili değildir. Başka bir deyişle, gen fonksiyonlarında meydana gelen mitotik, mayotik, kalıtsal değişimlerdir ve DNA dizisinde meydana gelen değişimlerle açıklanamazlar (Murrell 2005).

Yetişkin dönem kalıtımı ya da somatik hücre kalıtımı olarak da tanımlanabilir. Hücreler gen ifade kontrolünü nükleozomları kullanarak yaparlar. Nükleozomlar, DNA'nın globüler histon proteinleri etrafında sarılarak oluşturdukları eskiden kromomer olarak bilinen yapılardır. Nükleozomlar kromatin denilen yapıyı oluştururlar. Kromatin yapısındaki değişiklikler gen ifadesini kontrol eder. Kromatinin sıkılaşmış yoğunlaşmış halde inaktif iken (heterokromatin), gevşek hali (eukromatin) ise aktiftir (Jenuwein 2001).



Şekil 2.1. Genetik ve Epigenetiğin şematik gösterimi, genotip, nükleotidlerin yan yana dizilişiliyle oluşmakta, epigenotip ise bu dizilişe anlam ve değişik ifade biçimleri kazandırmaktadır (Bora 2007).

Kromatinin yapısındaki bu dinamik durum ise geri dönüştürülebilir olan, DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonları ile sağlanan epigenetik paternler ile değiştirilir. Bu işlemlerde görevli olan enzimler arasında DNA metiltransferazlar (DNMT), histon deasetilazlar (HDAC), histon asetilazlar (HAC), histon metil transferazlar ve metil binding protein MECP2 sayılabilir. Epigenetik değişimler genlerin sessizleşmesine (silencing) neden olurlar. Bu da geni inaktive edici bir mutasyon veya delesyon gibi genetik bir mekanizmayla eşdeğerdir. Ancak epigenetik değişimler geri dönüşümlü oluşları ve DNA'nın baz dizisinde bir değişime neden olmamaları gibi özellikleriyle genetik değişimlerden ayrılırlar (Jones et al 2002).

Çizelge 2.9. Epigenetik mekanizmalar (İnt. Kyn.5)

DOĞRUDAN ETKİLEYENLER		DOLAYLI ETKİLEYENLER
DNA Modifikasyonları	Kromatin Modifikasyonları	
	A.Kovalent Modifikasyonları (Histon Modifikasyonları)	B.Nonkovalent Modifikasyonları
1.DNA Metilasyonu	1.Asetilasyon	1.Histon takasları
2. Nonkovalent DNA Modifikasyonları	2.Metilasyon	2.Histon katımları
3.Transkripsiyon faktörleri ile feed- forward otoregülasyonu	3.Fosforilasyon	3.Kromatin tadilatı
	4.Übikitinasyon	4.Non-coding RNA ile etkileşim
		5.Diğer ajanlarla etkileşim
		6.Uzun mesafe kromozm etkileşimleri
Post transkripsiyonel mekanizmalar (mRNA sessizleşmesi)		

2.1.8.1. Epigenetik Mekanizmalarla Sessizleştirilen Genler

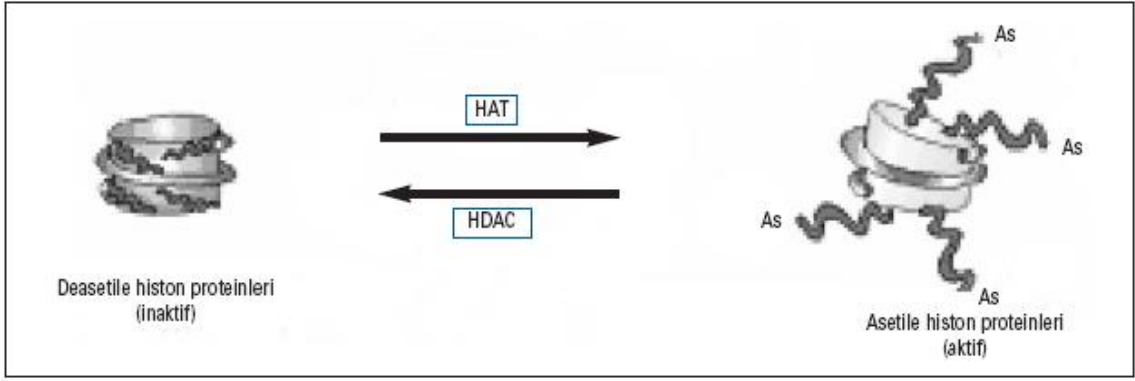
DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu birlikte, epigenetik regülasyonda, genomik imprinting, X inaktivasyonu ve genomun yeniden programlanmasında görev alırlar ve transkripsiyel faktör olarak epigenetik mekanizmada görev yaparlar. Tümörlerde genler sıklıkla metilasyon tarafından sessizleştirilirler.

- Hücre siklusunda etkili olan genler; RB1, p16INK 4a, p15INK4b (lösemi), p14 ARF (kolon, mide)
 - Sinyal iletiminde etkili olan genler; APC, LKB1/STK11, RASSF1
 - Apoptosiste etkili olan genler; DAPK (lenfoma), caspase-8
 - DNA tamirinde etkili olan genler; MGMT (beyin, akciğer, kolon ca. , lenfoma), BRCA1 (meme, over ca.), MLH1 (kolon, mide, endometriyum ca.),
 - Karsinogen metabolizmasında etkili olan genler; GSTP1 (meme, karaciğer, böbrek, prostat ca.),
 - Hormonal cevapda etkili olan genler; ER, PR RAR (kolon, akciğer, meme, lenfoma)
 - Metastazda etkili olan genler; E-cadherin, VHL
- olarak gösterilmiştir (Esteller 2002).

2.1.8.2. Histon modifikasyonları

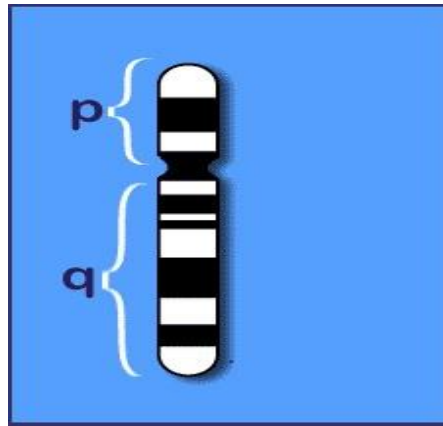
- Histon asetilasyonu / deasetilasyonu
- Histon metilasyonu
- Serin veya treoninlerin fosforilasyonu
- Glutamik asitlerin ADP-ribozilasyonu
- Histon ubiquitinasyonu

olarak ifade edilmiştir.



Şekil 2.2. Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu. HAT: Histon asetil transferaz, HDAC: Histon deasetilaz (Bora 2007).

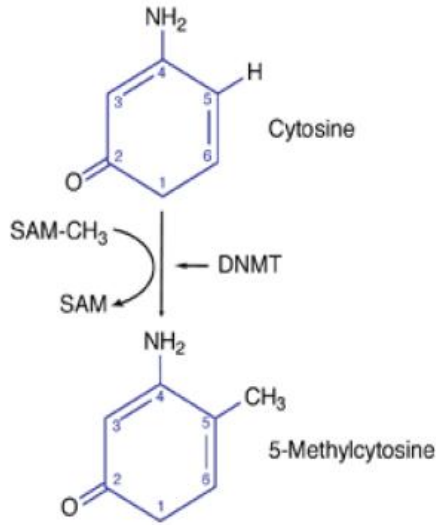
Tüm bu mekanizmalar, kromatin yapısında değişiklikler oluşturarak transkripsiyonu düzenleyici komplekslerin DNA'ya ulaşabilirliğini etkilerler. Ayrıca birçok histon modifikasyonu geri dönüşümlüdür ve modifikasyon seviyesi ile transkripsiyon seviyesi sıkı ilişki içerisindedir. Histon proteinleri DNA'nın paketlenmesinde görev alırken, nükleozomdan dışarıya çıkıntı yapan bazik NH₂ (amino) terminal uçları bir takım post-translasyonel modifikasyonlara uğrayabilir. Bu modifikasyonlar arasında; HAT (histon asetil transferaz)'lar tarafından asetillenme ve HMT (histon metil transferaz)'lar tarafından metillenme yer almaktadır (Jones et al 2002).



Şekil 2.3. Genler kromozomların kısa ve uzun kollarına yerleşmiştir (Roche 2005)

2.1.8.3.DNA Metilasyonu

Kromatin konformasyonundaki değişiklikler, gen ifadesinin düzenlenmesine yardım eden yollardan biridir. Gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan diğer bir önemli olay ise, DNA bazlarına metil grubunun eklenmesi ya da bu bazlardan metil grubunun çıkarılmasıyla ortaya çıkan kimyasal bir değişikliklerdir (Kass et al 1997). Birçok ökaryotik organizmanın DNA'sı, metil gruplarının enzim (DNA metiltransferaz) aracılığıyla bazlara eklenmesiyle replikasyondan sonra değiştirilir. Metillenme, DNA'daki CG çiftleri halinde bulunan sitozinlerden ve genellikle de her iki zincirde birden olur. Metilasyon, DNA dizisindeki guaninin önünde yerleşmiş sitozinlerin (CpG) 5. konumundaki karbonuna metil grubu bağlanması ile gerçekleşmekte ve bölgesel hipermetilasyon, promotör bölgede (gen ifadesini başlatan bölge) bulunan CpG adacıklarını etkileyerek genin aktivitesini durdurmaktadır. CpG adacıkları, sıklıkla promotör bölgeleri olarak işlev görürler ve ayrıca replikasyon başlangıç bölgeleri oldukları düşünülmektedir (Delgado et al 1998).



Şekil 2.4. DNA metilasyonunun mekanizması. SAM bir metil donörüdür. DNMT enzimi metilasyondaki katalizördür (İnt.Kyn.6).

Metillenmenin gen ifadesinin düzenlenmesindeki rolü ile ilgili en kuvvetli bulgular baz analogları ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bir baz analogu olan 5'-azasitidin nükleotiti, DNA'da sitozinin yerine girer ve bu molekül kimyasal olarak metillenemediği için, girdiği bölgelerde DNA'nın metillenmesi engellenir. 5'-azasitidin DNA'ya katılması, gen ifadesi olayını değiştirir ve inaktif X kromozomu üzerindeki allellerin ifadesi uyarılır (Bird 2002).

DNA metilasyonu, DNA metil modifikasyon sistemi olarak adlandırılır. DNA metil transferaz enzimi tarafından genel bir metil donörü olarak bilinen S-adenozil metioninden bir metil grubunun alınıp transfer edilmesi esasına dayanır. Memeli hücrelerinde modifiye sitozin (5'-mC) %90 oranında CpG dinükleotid yapısında bulunur ve episitozin olarak adlandırılır. Episitozin denilmesinin sebebi epigenetik kalıtımda rol almasındandır. Özellikle somatik hücrelerde gen işlevleri üzerinde önemli etkiye sahiptir (Egger 2004).

DNA metilasyon değişiklikleri genellikle CpG (Sitozin fosfo Guanin) dinükleotidlerinde meydana gelir. CpG dinükleotidleri genellikle hedef noktalarıdır ve 1-2 kb uzunluğundadır. CpG adaları olarak adlandırılır. Genin içinde ya da genin promotor bölgesi yakınında ve genlerin 1.ekzon bölgelerinde yer alırlar. CpG adalarının genomda görülme sıklığı %5-10 arasındadır. Memelilerde metilasyon semi-konservatif şekilde kalıtılır. DNA metilasyonu 1948 yılında Hotchkiss tarafından ilk olarak keşfedilen epigenetik marker olmuştur (Patel 2003).

2.1.8.4. 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 (Cooper 1983). Bazların metillenmesi genellikle sitozinden olur ve belirli herhangi bir ökaryotik organizmanın sitozinlerinin yaklaşık %5'i metillenir. Ancak, metilasyon derecesi dokuya özgüdür ve %2'den %7'nin üzerine çıkacak şekilde değişiklik gösterir. Baz metilasyonunun gen ifadesini değiştirdiğinin ortaya çıkarılması, E.coli'nin lac operonu ile yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Operatör bölgedeki

DNA'daki tek bir sitozinin metillenmesi bile, reseptörün operatöre olan ilgisinde fark edilebilir bir değişiklik meydana getirebilir. Sitozin 5' ucundan metillenir, böylece metil grubu DNA sarmalının büyük oluğundan 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).

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

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

Şekil 2.5. Karşılıklı zincirlerin C(Sitozin) bazı üzerinden metillenmesi.

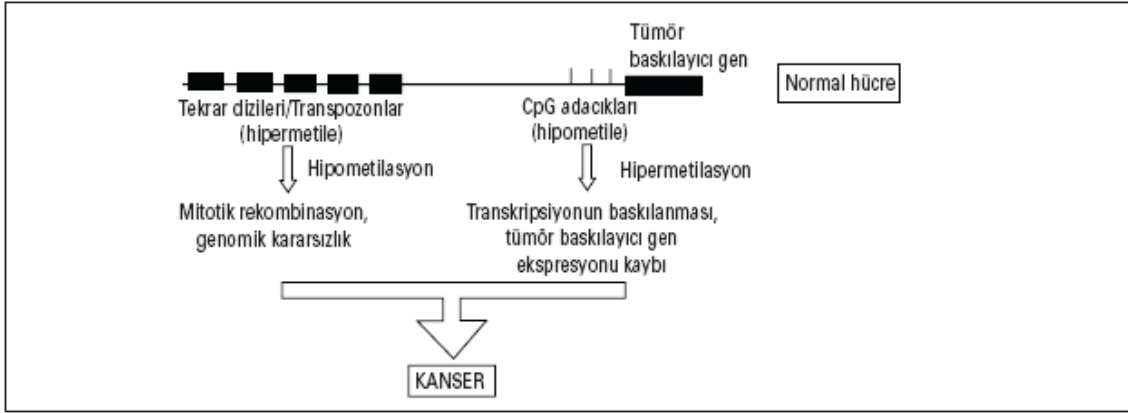
DNA metilasyonu üç mekanizma ile özetlenebilir;

- 1- Metillenmiş promotor bölgelerine bağlanabilen proteinlerin hedef dizilere bağlanarak, esas bağlanması gereken transkripsiyon faktörlerinin buralara bağlanmasını engelleyerek (Cottrell 2004)
- 2- Transkripsiyon faktörlerinin metillenmiş sitozine bağlanmasını engelleyerek (Gaudet 2003)
- 3- Kromatin yapısını değiştirerek transkripsiyon miktarında bir değişim gerçekleştirerek (Lengauer et al 1997).

İnsan kanserlerinde DNA metilasyon değişimlerinin 2 genel tipi gözlenmektedir.

1.Genomik Hipermetilasyon

2.Genomik Hipometilasyon



Şekil 2.6. DNA metilasyonu ve kanser (Bora 2007)

Genomik hipermetilasyon mekanizması ile başta tümör supresör genler (TSG) olmak üzere genomda hayati fonksiyonu olan pek çok gen hipermetile hale getirilerek sessizleştirilir;örneğin DNA tamiri, hücre siklus regülatörleri, apoptozis ve detoksifikasyonla ilişkili genlerin sessizleşmesi gen ifadesini negatif etkilemektedir. Çok sayıda tümör supresör genin promotor hipermetilasyonu ile transkripsiyonu inhibe edilmektedir (Bora 2007).

2.1.8.5. DNA Metilasyonunun Görev Aldığı Olaylar

DNA metilasyonu genomik imprinting, proto-onkogen aktivasyonu, tümör supresör gen inaktivasyonu, bazı kanser türlerinin başlatılması ve sürdürülmesi, somatik hücre farklılaşması ve onkogenez, hücre, doku ve allel spesifik gen inaktivasyonu ya da reaktivasyonu, X inaktivasyonu, genetik tedavi ve yaşlanma, genomun aktif gen ya da kondanse bölgeler şeklinde yapılanması, yerleşimi ve apoptoziste rol oynamaktadır. DNA metilasyonu ile genomun erken embriyonik gelişiminde, fertilizasyon sonrası genomun demetilasyonla genişletilmesinde ve blastokistin implantasyonundan sonra remetilasyonla yeniden şekillenmesinden sorumludur. Oosit gelişiminde ve imprinting olayında DNA metilasyonu esansiyeldir. Spermatogenez için DNMT3A ve onunla ilgili protein olan DNMT3I ve histon metil transferazlar Suv39h1 ve Suv39h2 gereklidir (Michalowsky 1989).

Zigot oluştuktan sonra, anne ve babaya ait (paternal) alleller kendi kimliklerini idame ettirirler ve bunun sonucunda bir allel (anne veya baba) tercihen ifade edilir. Bu bağlamda, CpG dinökleotidlerinin metilasyonu, paternal kromozomları farklı şekillerde işaretleyerek, bir genin sadece anneden ya da sadece babadan ifadesini sağlayan mekanizmalardan biri olarak dūřünölmektedir. Dolayısıyla, metilasyon somatik hücrelere kalıcı şekilde aktarılırken, gelecek nesilde bu metilasyon işaretleri ortadan kaldırılarak yeniden oluşturulabilir (Razin et al 1994).

2.2. KOLON KANSERİ

Kolorektal kanser (KRK) genetiği alanındaki çalışmalar günümüzde ivme kazanmıştır. 2007 yılı için kolorektal kanser genetiği ile ilgili PubMed taraması yapıldığında yaklaşık 2000'in üzerinde makale yayınlanmış olduğu gözlenmiştir. Adenomdan kansere geçiş kolorektal karsinogenez içlerinde başlıca tanımlanmış adenomatous polyposis coli (APC) gen aktivasyonu, K-ras onkogen aktivasyonu, p53 mutasyonu, kromozom instabilitesi, mikrosatellit instabilitesi gibi birçok genetik değişiklik sonucu olmaktadır (Vogelstein et al 1992).

Çizelge 2.10. Kanserlerin çeşitlerini erkeklerde ve kadınlarda görülme sıklığı (İnt.Kyn.1).

KANSER SIKLIĞI	
ERKEK	KADIN
Prostat % 29	Meme % 29
Akciğer % 14	Akciğer % 13
Kolon-rektum % 10	Kolon-rektum % 10
Üriner trakt % 9	Uterus % 8
Lösemi ve lenfoma % 8	Lösemi ve lenfoma % 6

Kolorektal kanser gelişimini etkileyen muhtemel nedenler diyet ve diğer çevresel faktörler, yaş, adenom ve karsinom öyküsünün olması, predispozan hastalıklar özellikle inflamatuvar barsak hastalıkları ve aile hikayesidir (Nakaji et al 2004).

Kalıtsal yatkınlığı olan bireylerde, kolorektal kanser gelişme riskinin %80 gibi yüksek bir oranda olduğu ve daha erken yaşlarda gelişebildiği için de herediter kolorektal kanser ailelerinin tanımlanmasının önemi inkar edilemez. Bununla birlikte, kolorektal kanserlerin erken tanı ve tedavi yaklaşımlarında, genetik mutasyonların önceden saptanmasının oldukça önemli yararı vardır. Erken tanı olanağının sağlanması ile tedavi başarı şansının artırılması yanında, tam küratif etkinin de elde edilebilmesi veya survinin çok anlamlı iyileştirilmesi olanaklarına imkan verecektir. Bu sonuçlarla, hem

bireysel olarak hasta için, hem de yakın aile çevresinde psikososyal, moral ve ekonomik yönden çok önemli kazanımlar sağlayacaktır. Ayrıca ek bir kazanım olarak, kolon kanseri tarama programlarına toplumsal uyum (compliance) artacak; herediter kolorektal kanser hastalarının akrabaları için de kanser riski yönünden uyarıcı olacaktır (Delattre 1989).

Çizelge 2.11. Kanserden ölümler erkeklerde ve kadınlarda kanser çeşidine göre değişmektedir (İnt. Kyn.1).

KANSERDEN ÖLÜMLER	
ERKEK	KADIN
Akciğer % 31	Akciğer % 24
Prostat % 13	Meme % 16
Kolon-rektum % 9	Kolon-rektum % 10
Üriner trakt % 5	Uterus % 5
Lösemi ve lenfoma % 8	Over % 5

Kolon kanseri gelişiminde doğuştan gelen ailesel yatkınlık ve daha sonra kazanılan genetik bozukluklar rol oynamaktadır. Kolon kanserlerine kalıtsal yatkınlığı tanımlamak dört nedenden dolayı önemlidir; birincisi, kolon kanserlerine kalıtsal yatkınlığı tanımlanan kişilerde kolon kanseri oluşma riski çok yüksektir (%80). İkinci olarak, patolojinin görülme yaşı sıklıkla ikinci dekad iken, sporadik vakalarda daha ileri yaşlarda da ortaya çıkabilmektedir. Üçüncü neden, kolon kanserlerine kalıtsal yatkınlığı olan bireylerin izlenmesinde özel tarama metodları gerekmektedir. Örneğin, sağ kolonda görülme sıklığı yüksek olan HNPCC'inin takibinde sigmoidoskopi yerine kolonoskopi önerilmektedir. Son olarak da, kolon kanserlerine kalıtsal yatkınlığı olan bireylerde endometrium ve over kanserlerinin insidansının yüksek olması sebebiyle kişilerin bu kanserler için de taranması gereklidir. Kolorektal kanser erken tanı konulduğu takdirde tedaviden en çok yararlanan kanser grubunu oluşturmaktadır. Bu nedenle tanının erken konulmasına veya risk altındaki grupların belirlenmesine yönelik uygulamalar önemlidir (Schwartz et al 1999).

Kolorektal karsinoma etiyopatogenezinde genetik zemin önemli olduğu gibi çevresel faktörlerin de etkisi vardır. İleri derecede risk faktörleri; ileri yaş, doğum yeri, Familial polipozis/Gardner sendromu, Herediter nonpolipozis kolorektal kanser, uzun süreli ülseratif kolitken, orta derecede risk faktörleri ise yüksek kırmızı et içeren diyetle beslenme tarzı, daha önce adenom hikâyesi olması, pelvik ışın tedavisi uygulanmış olmasıdır. Zayıf risk faktörleri ise; yüksek yağ içeren diyetle beslenme tarzı, alkol ve sigara içilmesi, obezite, uzun boy, kolesistektomi ameliyatı, yüksek sukroz tüketimi olarak gösterilmiştir. Koruyuculuk değeri az olan faktörler ise yüksek sebze meyve içeren diyet, yüksek folat/metionin alımı, yüksek kalsiyum alımı, postmenopozal hormon replasman tedavisi iken aspirinin ise koruyuculuk değeri orta derecededir (Corman 2002).

2.2.1. Kolon Kanserinde TNM Derecelendirme Sistemi

TNM derecelendirme sistemi, kanserin ne kadar uzağa yayılabildiğinin doktorlar tarafından tanımlanması için standardize edilmiş bir yoldur. Her bir kanser tipi için yapılan çalışma sonuçları American Joint Committee on Cancer (AJCC), uzmanlarınca değerlendirilir. Bu uzmanlar, muhtemelen tedaviden sorumlu ve her bir kanser tipi için en iyi tahmini fikri ve tıp araştırmalarından elde edilen bilgileri yeniden gözden geçirirler. Kanserın tüm çeşitleri için derecelendirme sisteminin ayrıntıları arasında farkları azdır, asıl konsepti aynıdır. Bazıları hariç tutulursa (lösemi ve beyin tümörleri gibi) kanserin her tipi için derecelendirme sistemi için kurulmuştur:

T kategorisi: Kanserın, organda ne kadar bir alana yayılmaya başladığı ve diğer yakın organ ve dokulara ilerleyip ilerlemediği.

N kategorisi: Kanserın lenf bezleri yakınlarına yayılıp yayılmadığı (küçük bean-ölçülü immün sistem hücrelerinin toplanması).

M kategorisi: Kanserın, vücudun uzak alanlarına metastaz (yayılma) yapıp yapmadığı.

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

T_x: Tamamlanamayan bilgi yüzünden tümör genişliğinin belirlenmesi mümkün değildir.

Tis: Kanserin en erken derecesidir. Kolon veya rektum mukozasının (iç tabaka) dışında büyümez.

T1: Kanser mukoza boyunca ilerler ve submukozaya yayılır.

T2: Kanser submukoza boyunca ilerler ve muskularis propria içine yayılır.

T3: Kanser muskularis propria boyunca subserosa içine ilerlemesini tamamlamıştır, fakat yakın doku ve organlara ilerlememiştir.

T4: Kanser kolon veya rektum duvarı boyunca yakın doku ve organlara yayılımını tamamlamıştır.

N kategorisi, kanserin lenf bezleri yakınlarına yayılıp yayılmadığını işaret eder, eğer öyleyse, lenf bezlerinin ne kadarını kapsamaktadır.

N_x: Tamamlanamayan bilgi yüzünden lenf bezlerine yayılımı belirlenememiştir.

N0: Lenf bezlerinde bulunamamıştır.

N1: Kanser hücreleri üç bölgesel lenf bezlerinde bulunmuştur.

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

M kategorisi uzak organlara yayılıp yayılmadığını işaret eder, örneğin, karaciğer, akciğer veya lenf bezleri uzağına.

M_x: Tamamlanamayan bilgi yüzünden uzak alanlara yayıldığı belirlenememiştir.

M0: Kanser uzak alanlara yayılım göstermemiştir.

M1: Uzak alanlara yayılım gösterir (Durhan 2006).

2.2.2. Kolon Kanserinde Evre Gruplaması

Bir hastanın T, N, M kategorileri, genellikle cerrahiden sonra belirlenmektedir, bu bilgi evre 0'dan evre IV'e roman rakamlarıyla ifade edilir. Belirlenen evre gruplaması olarak adlandırılan bir süreçle birleştirilmektedir. TNM kategorilerini nasıl takip edildiği kılavuz, evrelerinin birbirleriyle gruplaştırmıştır.

Evre 0 (Tis, N0, M0): Kanserde en erken evredir. Kolon ve rektumun iç tabakası (mukoza) dışında ilerlemez. Bu stage, intramukozal karsinoma veya karsinoma in situ olarak da bilinir.

Evre I (T1, N0, M0 veya T2, N0, M0): Kanser submukoza içinde mukozaya doğru ilerler veya muskularis propria içine de ilerleyebilir. Fakat lenf bezlerine veya uzak alanlara yayılmaz.

Evre IIA (T3, N0, M0): Kanser en dıştaki tabaka içine kolon veya rektum duvarına doğru ilerler. Henüz lenf bezlerine veya uzak alanlara yayılmaz.

Evre IIB (T4, N0, M0): Kanser yakınlardaki doku veya organlara kolon veya rektum duvarına doğru ilerler. Henüz lenf bezlerine veya uzak alanlara yayılmaz.

Evre IIIA (T1-2, N1, M0): Kanser submukoza içine mukozaya doğru ilerler veya muskularis propria içine doğru da ilerleyebilir ve üç lenf bezinden birine yayılır fakat uzak alanlara yayılmaz.

Evre IIIB (T3-4, N1, M0): Kanser kolon veya rektum duvarına doğru veya diğer yakın doku veya organlara ilerler ve yakınlardaki üç lenf bezinden birine yayılır fakat uzak alanlara yayılmaz.

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

Evre IV (Any T, Any N, M1): Kanser N, T olmayabilir fakat uzak alanlara yayılır, örneğin karaciğer, akciğer, periton (membrana uzanan abdominal çukur) (Durhan 2006)

2.3. DNA TAMİR MEKANİZMALARI

Genom, DNA hasarına neden olan sayısız farklı etkene maruz kalır. Hasar kaynakları eksojen veya endojen olabilir. Eksojen kaynaklar içerisinde, güneşten gelen ultraviyole radyasyon, radon bozunumundan kaynaklanan iyonize radyasyon, mantar kaynaklı aflatoksin, yanmış tütün ve birçok kemoterapötüğü sayabiliriz. Endojen kaynaklara örnek olarak, oksidatif metabolizma, DNA'nın spontan değişimleri, immünolojik çeşitliliği oluşturan V(D)J rekombinasyon mekanizmasını (antijen tanıma bölgelerini kodlayan ekson V,D ve J şeklinde üç segmentten oluşur. ve bu segmentlerin birçoğu farklı kombinasyonlarla bir araya gelebilir) verebiliriz. Farklı biyokimyasal stratejileri kullanan birçok mekanizma DNA hasarının birçok şeklini onarır. DNA onarım genleri, genomun önemli bir bölümünden sorumludur (Aquilina 1994).



Şekil 2.7. DNA zincirinde bazlar belirli bir düze içerisinde dizilir (Roche 2005).

Hücreler DNA hasarının onarımı için birçok mekanizmaya sahiptir. Birçok DNA onarım geni, DNA metabolizmasında başka görevler de üstlenir. Örneğin, TFIIH, hem transkripsiyonun başlangıcında, hem de nükleotid çıkarma onarımında görev alır. Çift zincir kırığı onarım genleri de ayrıca immün sistemin oluşumunda görev alır. DNA onarımındaki bozukluklar, meme, kolon ve cilt kanseri gibi birçok kanser türüne neden olduğu gibi, ayrıca, büyüme ve beyin anomalilerine de sebep olur. Birçok kanser hücresinde, artırılmış DNA onarımı, kanser tedavisine gelişen dirençle ilişkilendirilebilir, bu nedenle, tedavi şekli olarak, DNA onarımında görev alan

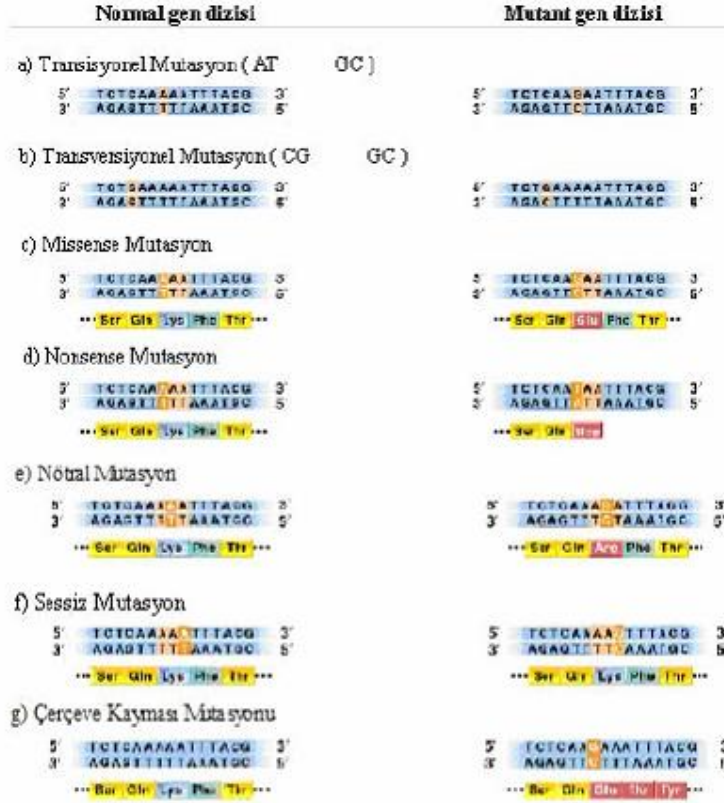
proteinlerin inaktivasyonu veya ekspresyonlarının azaltılması yönüne gidilebilir (Debeleş-Bütüner 2006).

Tüm organizmalar (bakteri, maya, drosophila, balıklar ve insanlar dahil), hücreleri çevresel hasarlara karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizması içerirler. DNA onarımı, hücre ölümünü, mutasyonu, replikasyon hatalarını (RER), DNA hasarının devamlılığını ve genomik kararsızlığı azaltan bütün işlemlerde kullanılır. Bu işlemlerdeki bir anormallik kansere ve yaşlanmaya yol açar DNA onarım hatalarının, genomik kararsızlıkla karakterize sendromlara ve kanser insidansında artışa varan sonuçlar doğurduğu düşünüldüğünde, DNA onarımının önemi anlaşılmaktadır. İnsanda DNA onarımı ile bağlantılı 130 genin klonlanması ve dizi analizi tamamlanmıştır. DNA onarım genleri iki altgruba ayrılabilir.

1) DNA onarımında sinyal iletimi ve onarımın düzenlenmesi ile ilgili genler,

2) Hatalı eşleşme onarımı, baz çıkarma onarımı, nükleotit çıkarma onarımı gibi ayrı onarım mekanizmaları ile ilgili genler (Debeleş-Bütüner 2006).

Prokaryot ve ökaryot hücrelerdeki meydana gelen DNA tamir mekanizmaları DNA Çift-Zincir Kırığı Onarımı, Oksidatif Hasarın Onarımı, Baz Hasarı Onarım Mekanizmaları, Baz Çıkarma Onarımı (Base Excision Repair/BER), Nükleotid Çıkarma Onarımı (Nucleotide Excision Repair / NER), Transkripsiyona Bağlı Onarım (Transcription Coupled Repair/TCR), Hatalı-Eşleşme Onarımı (Mismatch Repair) şeklinde özetlenebilir.



Şekil 2.8. Genler kromozomların kısa ve uzun kollarına yerleşmiştir (Debeleç-Bütüner 2006)

2.3.1. Hatalı-Eşleşme Onarımı (Mismatch Repair)

Bu onarım mekanizması, DNA replikasyonu esnasında meydana gelen ve çift sarmalda anormal boyutlara neden olan, normal bazların hatalı eşleşmesi şeklindeki hataları düzeltir. Örneğin, *E. coli*'de hatalı eşleşme 7 proteinden oluşan bir sistem tarafından belirlenir. Bu proteinler, mutS, mutL, mutH, uvrD, ekzonükleaz I, SSB ve DNA polimeraz III tür. *E. coli* DNA'sında, (5')GATC dizisindeki adeninler özel bir metilaz olan "Dam Metilaz" tarafından metillenmiştir. Replikasyon esnasında kalıp zincir metillenmiş durumdadır. Ancak, yeni sentezlenen zincir birkaç dakikalık bir gecikme ile metillenir. Bu zaman sürecinde yeni zincirdeki hatalı eşleşen bazlar mutS tarafından tanınır. Sırayla mutL ve mutH bir kompleks oluşturmak üzere sisteme katılırlar ve DNA boyunca çift yönlü olarak metillenmemiş bir GATC buluncaya kadar hareket ederler.

MutH'deki endonükleaz fonksiyonu metil grubunun karşısında metillenmemiş zincire bir çentik atmak üzere aktive olur. Metillenmemiş zincir, ekzonükleaz I, SSB ve uvrD helikaz'ın birlikte hareketi ile uzaklaştırılır. DNA polimeraz III doğru DNA zincirini tekrar oluşturur ve ligasyon ile onarım sona erer. GATC bölgesi ile hatalı eşleşme arasındaki uzaklık en çok 1000 bp olabilir. Bu nedenle hatalı eşleşme onarımı etkili bir onarım mekanizması değildir .

İnsan hatalı eşleşme onarım proteinleri:

<u><i>E. coli</i></u>	<u>İnsan</u>
MutS	MSH2 – MSH6
MutS	MSH2 – MSH3
MutS	MSH4 – MSH6
MutL	MLH1 – PMS2, PMS1, MLH3

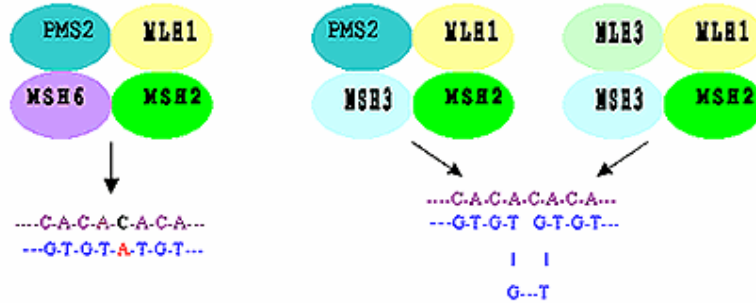
Ökaryotlar da *E.coli*'deki mut proteinlerine homolog proteinlere sahiptir. Ancak yeni sentezlenen zinciri ayırmak için *E. coli*'ye özgü metilasyon işleminin yerine kullanılan mekanizma henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Hatalı eşleşme onarım mekanizması genlerinde mutasyon olan bireylerin kalıtsal nonpolipozal kolon kanserine (HPNCC) yatkın oldukları tespit edilmiştir Hücre tüm bu DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarları hücrenin apoptoz yolunu aktive ederek hücreyi ölüme götürür. Hücre, DNA hasarlarını DNA tamir mekanizmaları ile tamir edebilir. DNA hasarı replikasyon sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa neden olur. DNA'da birçok özgün değişimi içine alan genomik kararsızlık, hem kanserin hem de yaşlanmanın önemli bir belirtisidir (Debeleç-Bütüner 2006).

2.3.1.1. MLH1 Geni

E.coli de MutL geninin homologu olan MLH1 geni DNA hatalı eşleşme onarımına katılır. Kalıtsal nonpolyposis kolorektal kanserinde Papadopoulos ve ark. (1995) tarafından bakteri ve mayanın homologu olan MLH1 geni mutasyonları bulundu.

Genuardi ve arkadaşları MLH1 gen normal alternatif splicing karakterize ve çeşitli doku tipleri için değişik bir dizi bildirdi.

Ellison ve ark (2001) nicel olarak in vivo çalışmalarla DNA hatalı-eşleşme onarımında, *S. cerevisiae* ile yapılan denemelerde MLH1 ve MSH2 genlerin içinde amino asit yerine fonksiyonel önemi belirlemek için yapılan insan popülasyonları üzerindeki çalışmalar görülmektedir. Sessiz kodonlar önce insan genlerinde ve maya MLH1 veya MSH2 genleri olarak homologları görülmektedir. Fonksiyonel sonuçlar ve mevcut insan klinik veriler missense codon ve penetrance ilgili arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermişler. Yazarlar DNA MMR ve verimlilik farklılıkları insan nüfusunun yaygın polimorfizm inediyle bireyler arasında mevcut ilişki önerdi(Ellison et al 2001).



Şekil 2.9. Tek baz hataları ile birden fazla baz hatalarında MMR proteinlerin etkileşim mekanizması değişmektedir.

2.3.1.2. MSH2 Geni

E. coli MutS geninin homologu olup DNA hatalı-eşleşme onarımına katılır. Kalıtsal nonpolyposis kolorektal kanser içinde MSH2 gen heterozigot mutasyonları tesbit edilmiştir (Fishel et al 1993).

Genetik analizi *Saccharomyces cerevisiae* hatalı-eşleşme tamir sistemi bakteriyel MutHLS sistemine benzerlik vardır. *S. cerevisiae* patika bir MutS homolog, MSH2 vardır. Her iki bakteri ve *S. cerevisiae* için hatalı eşleşme onarım DNA genetik istikrarın korunması bir rol oynamaktadır (Fishel et al 1993).

MSH2 geni için alternatif splicing varlığını bildirildi (Genuardi et al 1998). İkili RT-PCR, normal bireyler ve kalıtsal nonpolyposis kolon kanseri hastalarının çeşitli doku örneklerinin MSH2 gen ürünlerinin ekzon 5, 13, 2-7 ve 2-8 eksik belirlendi. İfade düzeyi farklı örnekler arasında çeşitli izoform olarak mononükleer kan örnekleri ile uyumlu diğer dokular bulundu (Genuardi et al 1998).

2.3.1.3. MSH6 Geni

Kromozom 2p16 da lokalizedir. 2p16 için somatik hücre kromozom 2 parçalı bir panel PCR değerlendirme ile GTBP gen yerleştirilmiş. GTBP ye benzer YAC olarak MSH2 olarak oturuyor bulundu, bu YAC nüfusunun temelinde, 1 Mb MSH2 dahilinde bulunduğu ortaya çıktı. Lokalizasyonu FISH ile doğrulandı. Böylece, MSH2 ve GTBP bir başlangıçta mutS onarım gen çoğaltılması ürettiği olabileceği tahmin edilirdi. Bitişik iki genler v memeli genomunda az değildir (Papadopoulos et al 1995).

2.3.1.4. MLH3 Geni

HNPCC ailelerde MLH3 mutasyonları rolü araştırılmıştır. 288 hasta HNPCC olduğundan şüpheli olarak değerlendirilmiş ve 10 farklı germline MLH3 türevleri, 1 ve 9 missense mutasyonları, 12 hastada HNPCC şüpheli olarak çerçeve kayması mutasyonları belirlendi. Exon 1 exon 11 yerleştiği gözlemlendi ve 1 ekzon 12 ekzon oldu (Wu et al 2001).

Lipkin ve ark. (2000) farelerde MLH3 gastrointestinal epitelinde kolon kanseri duyarlılığı(Ccs1) için fiziksel haritalar ifade edildiğini belirttiler.MLH3 ile, Pms1 ve Pms2 arasında fonksiyonel bağımlılık Pms1 Pms2 ile aynı oranda olmadığı açıklamadı. Kolon kanseri gelişmesine sebep olan PMS1 ve PMS2 mutasyonları sadece ekseriyetle HNPCC aileler bulunduğu ifade edildi.

2.3.1.5. PMS2 Geni

7p22 ye lokalize olmuştur. İnsan genleri ve ifade dizisi etiketi (EST) yöntemi ile Papadopoulos ve arkadaşları tarafından ESTs PMS1 gen insan genleri ve PMS2 PMS1 belirlenmiş olduğunu belirlendi. İnsan PMS2 çoğaltma ve dizi analizi bir 862-tortu proteini maya PMS1 32% kimliğiyle öngörüsünde bulundu. PMS2 geni 16 kb kapsadığı ve 15 ekzon içerdiği bulundu.

Nicolaides ve ark. (1996) kromozom 7 somatik hücre hibrid analizi ve 7p22 için FISH ile PMS2 genine eşleme yaptılar. Aynı araştırmacılar PMS2 nin ekzonlarını içeren 15 kopya psödojen belirledi. Hayward ve ark. (2007) PMS2 ve PMS2CL arasında dizi transferi veya gen dönüşümünün, bir tür devam eden güvenilir bir süreç olduğunu göstermiştir. PCR ampliconları oluşturmak için exon 10 PMS2CL psödojeni kullandıkları bildirildi.

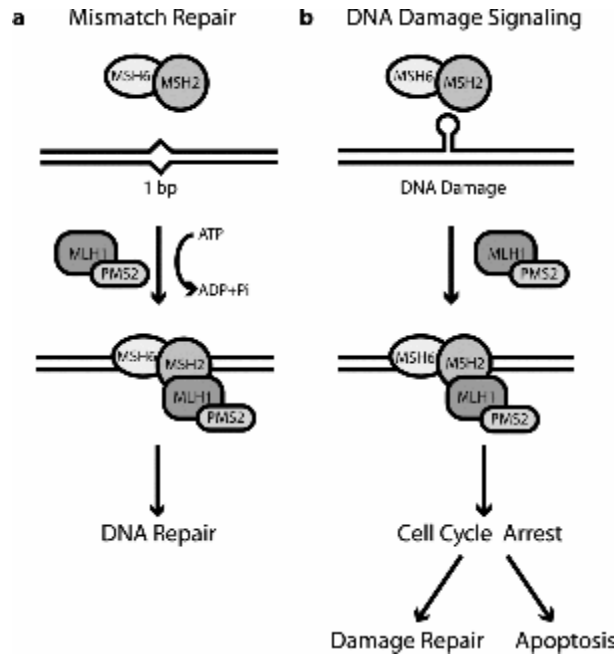
2.3.1.6. MSH3 Geni

Akiyama ve ark. (1997) MSH3 kalıtsal nonpolyposis kolorektal kanser hastalarında tümörlerde somatik mutasyonlarla microsatellite istikrarsızlığa(MI) eğilim gösterdiği bildirildi. Hatalı eşleşme onarımı ve germline mutasyonlarının tamirinde etkisi tesbit edildi. Bu veriler, hatalı eşleşme onarımında mutasyonlu MSH3 ile, şiddetli microsatelit istikrarsızlıkla sonuçlanabilecek bir hata onarım gen mutasyonu ve sıklığını artırmaktadır.

Benzer bir sonuç geldi bildirildi; MSH3 ve MSH6 gibi DNA hatalı eşleşme tamir genleri, ilerleyen hatalı eşleşme tamir gen mutasyonları gelişmiş genomik istikrarsızlığın çoğaltılmasına katkı sağlayan mutasyonları birikiminin hızlandırmasını sağlayacaktır (Yin et al 1997).

2.3.1.7. MGMT Geni

Kromozom 10q26 da lokalizedir. O (6)-alkylguanine DNA nın önde gelen mutajenik ve kanserojen olup, DNA replikasyonu sırasında timin ile eşleştirmede basit alkilleyici mutajen olduğu belirtildi (Rydberg et al 1990). Bu protein, gerçek enzimlerden farklı olarak, bir stometrik ikinci sırada tepki olarak gelen alkil grubu kabul edilmektedir.



Şekil 2.10. Hatalı-eşleşme tamirinde görev alan genlerin çalışma mekanizması (Scherer et al 2005).

Şekil 2.10'da görüldüğü gibi hatalı-eşleşme tamir mekanizması MMR proteinlerinin birbirleri ile kompleks oluşturarak yürüttükleri birkaç basamaklı bir mekanizma esasına dayanır. Kompleksteki proteinlerden olmaması süreci olumsuz etkiler. MSH6 ve MSH2 proteinleri DNA üzerindeki hatalı diziyi tanır. Ardından MLH1 ve PMS2 proteinleri fosforilasyonu ile toplam kompleks oluşur, sonra DNA tamir işlemi başlar ya da hücre siklusu durdurulur ve apoptoz tetiklenir.

2.3.2. Kalıtsal Kolon Kanseri ve DNA Tamir Bozuklukları

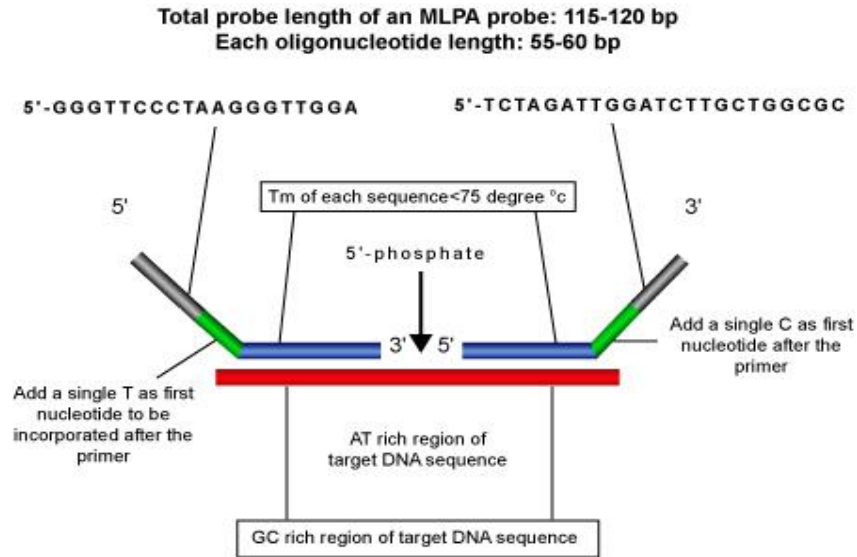
Kolorektal kanser (CRC) olgularının yaklaşık %20'sinde aile öyküsü mevcut olup; %1'i ise herediter kolorektal kanser olgularıdır. Herediter kolorektal kanserler “familial adenomatöz polipozis (FAP)” ve “herediter nonpolipozis kolorektal kanser (HNPCC)” olmak üzere başlıca 2 grupta incelenebilir. Kolorektal kanserlerden FAP'da kromozom 5q21'de bulunan adenomatöz polipozis koli (APC) ve HNPCC'inde MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, ve PMS2 DNA “mismatch repair (MMR)” genlerindeki mutasyonlar sorumlu tutulmaktadır. Bu mutasyonlarla birlikte, eş zamanlı veya ardışık olarak birden fazla farklı organ tümörü gelişimi yaygındır (Worthley et al 2007).

Kalıtsal kolorektal kanserler içerisinde “Familial” adenomatöz polipozis (FAP) sendromu ve “Herediter non-polipozis colorectal cancer” (HNPCC) sendromu olmak üzere iki ana grup vardır. Her ikisi de ebeveynden çocuğa geçer; FAP sendromunda adenomatöz polipozis “coli” (APC) geninde, HNPCC sendromunda ise DNA “mismatch repair” genlerinde germline mutasyonu vardır (Jen et al 1994).

HNPCC, tüm KRK olgularının %2-7'sini oluşturur. Kalıtsal KRK'lerin en sık tipidir. Lynch tarafından “Kanser Ailesi Sendromu” olarak tanımlanmıştır. Hastalık otozomal dominant kalıtımla aktarılır. DNA “mismatch repair” (MMR) genlerindeki (MLH1, MSH2,MSH6, PMS1, PMS2, MLH3 ve MSH3) mutasyon sonucu oluşur (Petersen et al 2001).

2.4. MULTİPLEKS LİGASYON ESASLI PROB AMPLİFİKASYONU (MLPA)

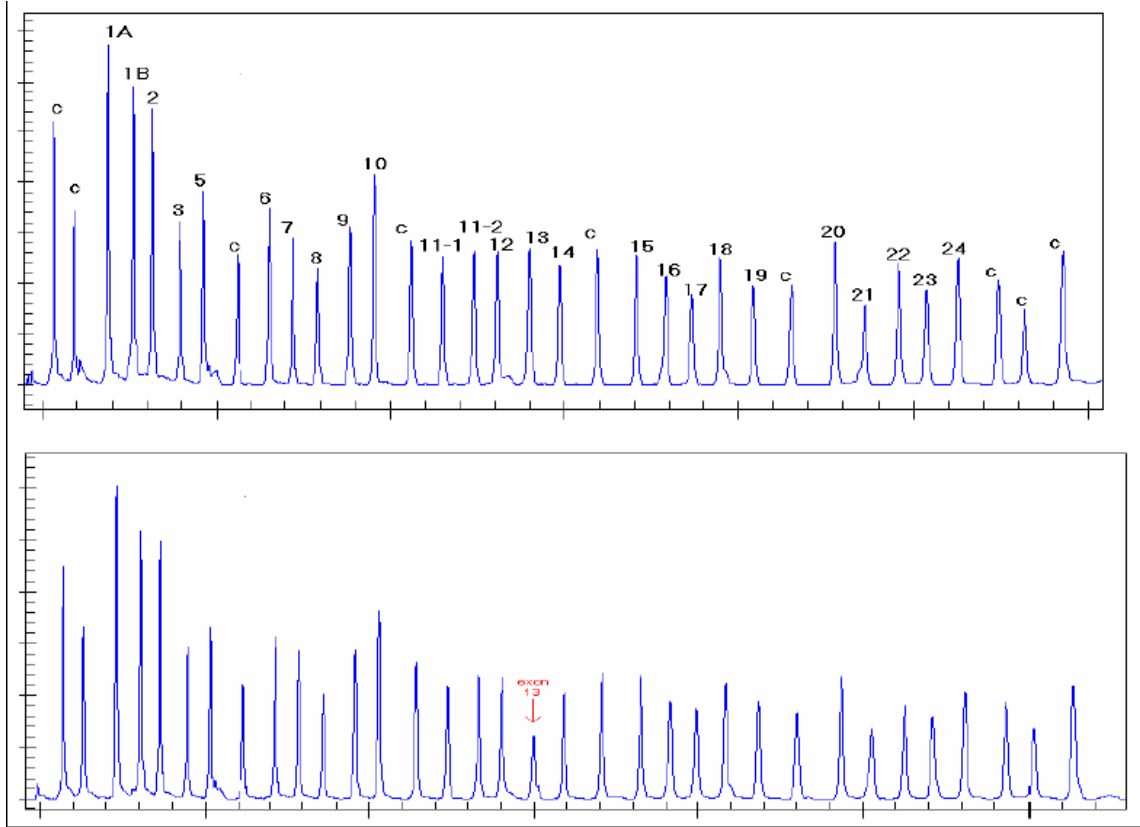
Multipleks ligasyon esaslı prob amplifikasyonu (MLPA), basit bir reaksiyonda 45' e yakın nükleik asit dizisindeki kopya sayısı değişikliklerini tespit eden bir metottür. MLPA tekniği, genomik DNA analizinde kullanıldığı gibi, mRNA'da da kullanılabilir. CpG metilasyonunun multipleks ölçümünde yarı kantitatif olarak kullanılmaktadır. Çeşitli genlerde amplifikasyon ve delesyonların tespiti amacıyla MLPA tekniği, multipleks bir PCR ile 45 farklı spesifik dizilimin aynı anda ölçülmesine olanak sağlamaktadır. Amplifikasyon ürünleri, sekans türü elektroforezler tarafından fragman analizi yapılarak ayırılmaktadır. 130 ile 490 bp' e kadar fragment sayısı ile, tekrar tekrar kopyalanabilirliği çok yüksek olan jel şablonu elde edilen teknikte, sadece 1 çift PCR primeri kullanılır. Bir kontrolden elde edilen ile bu jel şablonunun karşılaştırılması, hangi dizilerin tipik olmayan kopya sayıları gösterdiğini belirtmektedir. 45 farklı dizilimi hedefleyen MLPA reaksiyonu, sadece 20 ng insan DNA'sı gerektirir ve sadece bir nükleotitteki farklılığı içeren dizilimleri ayırabilme potansiyeline sahiptir. BAC arrays ve FISH' den farklı olarak, tespit edilen dizilimler küçüktür (yaklaşık 60 nükleotit). Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında, MLPA reaksiyonları hızlı ve kullanımını kolaydır (MRC 2005).



Şekil 2.11. MLPA prob dizaynı (MRC 2007).

2.4.1. MS-MLPA Tekniği

MLPA, sadece bir çift PCR primeri kullanılarak aynı anda 45' e yakın spesifik dizilimin amplifiye edildiği bir multipleks PCR reaksiyonudur. Amplifikasyon ürünleri sekans tip elektroforez ile ayrıştırılır.



Şekil 2.12. BRCA1 MLPA kiti ile analiz edilen ekzon 13' de bir delezyon ile karakterize DNA örneği(MRC 2005).

MLPA amplifikasyon reaksiyonunda kopyalanabilirlik yüksek olsa da, bazı dizilimler her PCR döngüsü süresince %1-2 daha düşük etkinlikle amplifiye edilir, bu da daha düşük bir pik alanıyla sonuçlanır. Bu yüzden tek bir MLPA amplifikasyon profili gerekli bilgiyi sağlayamayacaktır. Bir MLPA profili bir kontrol DNA örneğinden elde edilen benzer bir profile karşılaştırılmaktadır. Bir kontrol reaksiyonuyla karşılaştırıldığında, her amplifikasyon ürününün oransal pik alanı, analiz edilen örnekte, o probun hedef diziliminin oransal kopya sayısını yansıtır. Bu yüzden bir kromozomun

bir ya da daha fazla ekzonunda bir eksilme bu ekzonların problemlerinin amplifikasyon ürünlerinin oransal pik alanlarında bir azalma olarak tespit edilir.

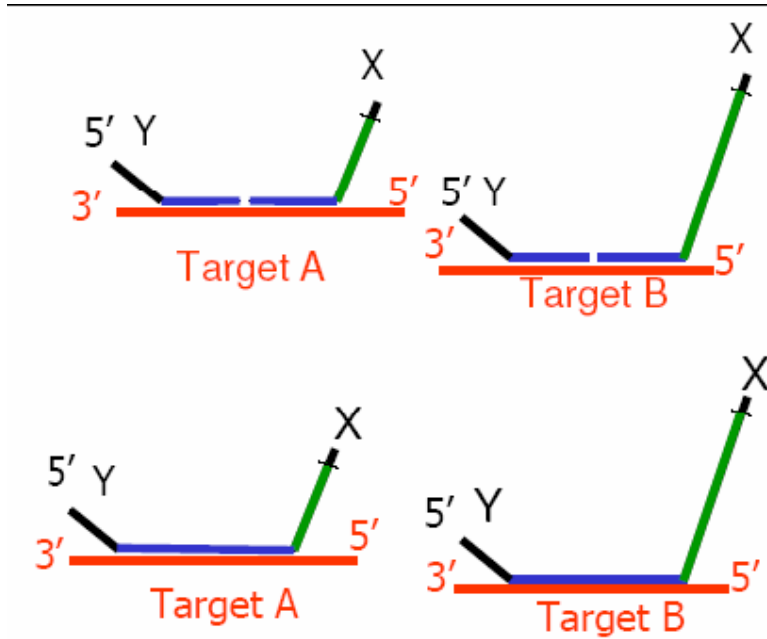
MLPA testleri, her amplifikasyon ürününün uzunluğu farklı olacak şekilde tasarlanmıştır. Mevcut MLPA kitlerinde farklı amplifikasyon ürünleri arasındaki uzunluk farkı genellikle 9 nükleotiddir. MLPA amplifikasyon ürünleri 130 nükleotid ve 480 nükleotid büyüklüğü arasında dizilmektedir. Bu büyüklük dizilimi sekans tip jellerde optimal bir ayrışmayı sağlamaktadır. Normal multipleks PCR' da amplifiye edilecek her fragment için bir çift PCR primeri gereklidir. PCR reaksiyonu süresince bu primerlerin çok sayıda mevcut olması gerekir ve farklı primerlerin çok sayıda bulunması problemlere yol açar. Reaksiyon koşullarındaki küçük farklılıklar genellikle elde edilen sonuçlarda büyük farklılıklara yol açar. Bütün fragmentler sadece bir çift PCR primeri kullanılarak amplifiye edildiği için MLPA reaksiyonları daha güvenilirdir. Geleneksel multipleks PCR ile bu mümkün değildir. Halbuki MLPA' da nükleik asit örnekleri amplifiye edilmez. MLPA' da, her bir hedef dizilimine iki prob'un hibridizasyonu ve ardından bir ligasyon reaksiyonu sonucunda, her bir hedef dizilimin kopyası yapılır. Bu kopya dizilimler sadece bir çift primerin kullanılmasıyla bir multipleks PCR reaksiyonunda amplifiye edilir (SALSA 2008).

Her hedef dizilimin bir kopyasını yapmak için, tespit edilecek ve ölçülecek her dizilim için nükleik asit numunesine spesifik MLPA problemleri eklenir. Bu MLPA problemleri, tespit edilecek hedef dizilimde birbirine bitişik bölgelere bağlanan iki oligonükleotitten oluşur. Bu iki oligonükleotitten her biri PCR primerleri tarafından tanınan iki dizilimden birisini içerir. Her probun iki kısmı spesifik bir ligaz enzimiyle birbirine bağlanabilir, fakat bu durum onların sadece her ikisinin de hedef dizilimin birbirine bitişik bölgelerine bağlandığında gerçekleşir (SALSA 2008).

- Örnek DNA'da hedeflenen dizilime probun bağlanmasından sonra, probun içerdiği oligonükleotitler enzimsel olarak bağlanırlar.
- Ligasyon ürünleri X ve Y PCR primer dizileri kullanılarak amplifiye edilebilir.
- Bir probun oligonükleotidi çeşitli uzunlukta bağlanmayan gereksiz diziler içerir

- Ligasyon ürünleri, bir fragmentte her iki PCR primer dizisini içerir ve PCR reaksiyonunda hızla amplifiye edilebilir. Ligate edilmeyen probe oligonükleotitler amplifiye edilemediği için ortamdan uzaklaştırılmalarına gerek yoktur.

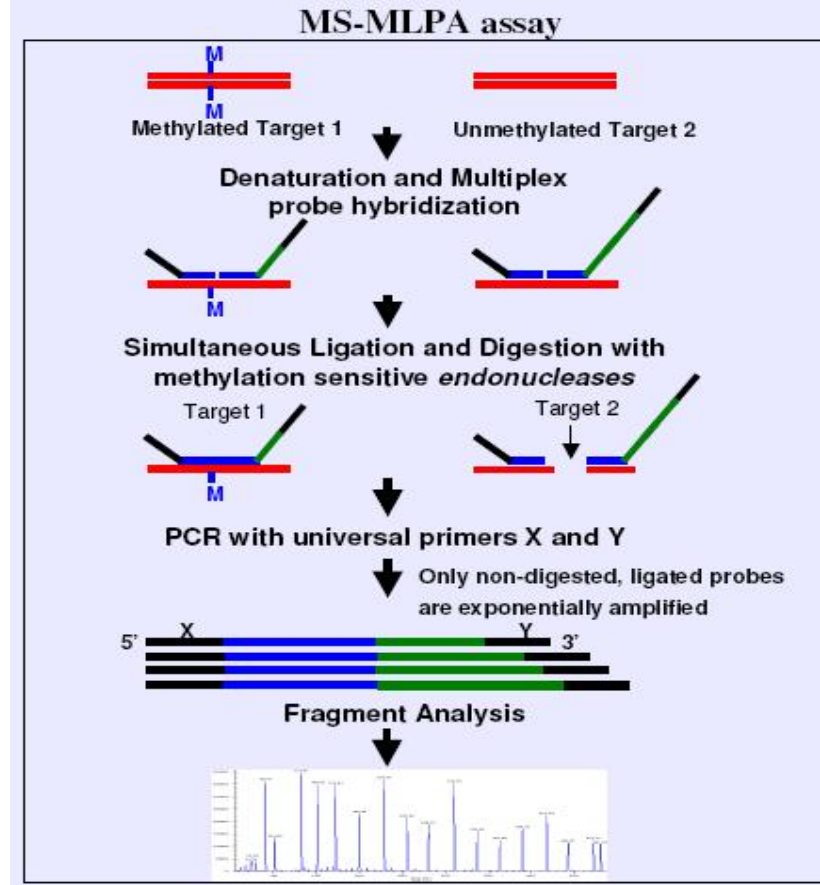
- Böylelikle her prob iki oligonükleotit içerir ve bir MLPA probe karışımında 45'e yakın probe mevcuttur. MLPA reaksiyonundaki problemlerin yoğunluğu ve hibridizasyon reaksiyonunun süresi, hedef dizilimlerin kendi karıştları olan probe oligonükleotitlerle hemen hemen tamamen hibridize olmasına imkan sağlayacak kadar yeterlidir. Hibridizasyon süresini uzatmak ya da daha fazla prob katmak, elde edilen sonuçları etkilemeyecektir. Normal bir MLPA reaksiyonunda, 60 ng insan DNA örneğinde tüm hedef dizilimlerin sadece 20.000 kopyası varken, her prob oligonükleotidinin kopyalanması yaklaşık 500.000.000'dur.



Şekil 2.13. MLPA problemlerinin hedef bölgelerinde hibridize olması ve ligasyonu (MRC MS MLPA 2007).

- Sadece hedef dizilime hibridize olan problemler ligate edilir ve PCR reaksiyonunda hızla amplifiye edilir. Prob moleküllerinin çoğu bir hedef dizilim bulamayacaktır ve bir floresans sinyal ile sonuçlanmayacaktır

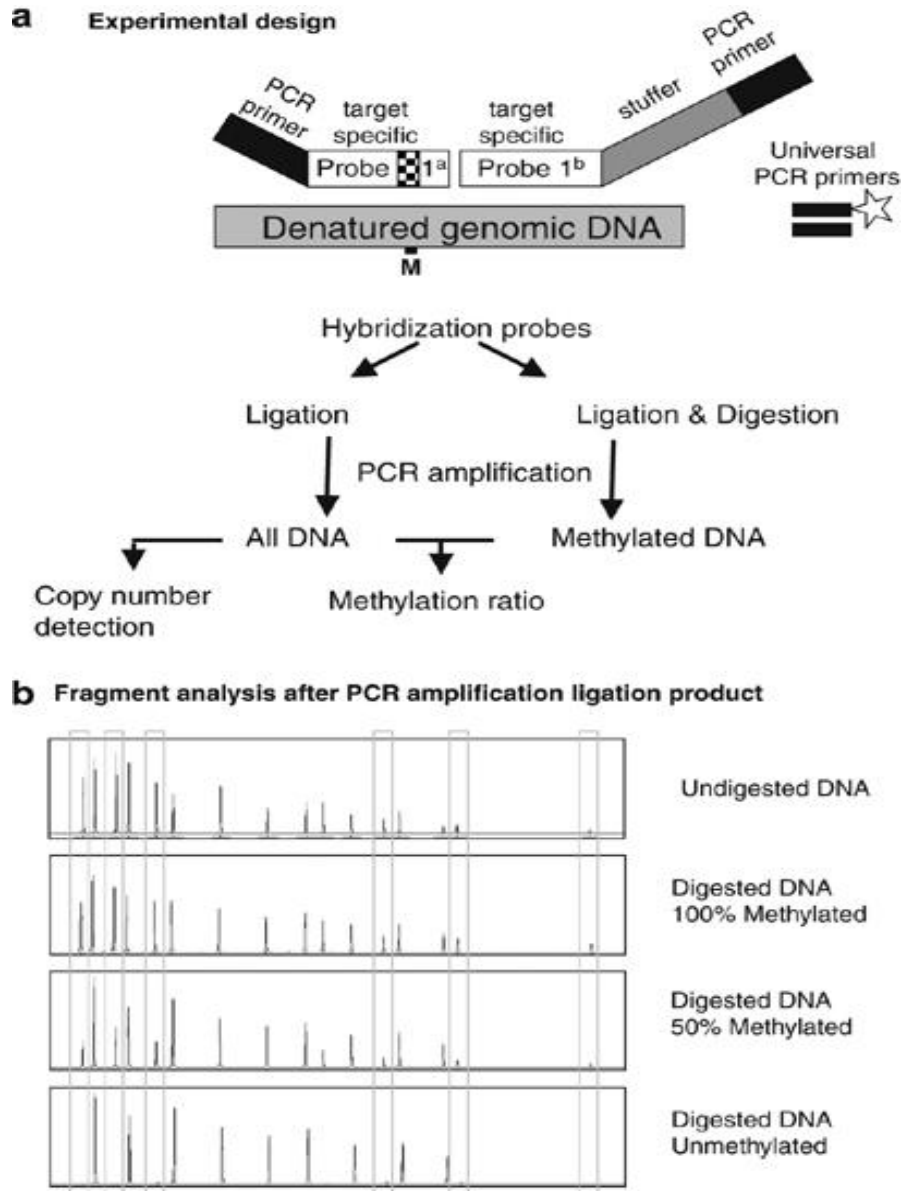
- Her amplifikasyon ürününün oransal sinyal gücü, örnekteki hedef dizilimin kopya sayısına bağlıdır.



Şekil 2.14. MLPA yöntemi ile metilasyon durumunun belirlenmesini sağlayan tekniğin basamakları (MRC MS MLPA 2007).

Bir hedef dizilim bulamayan MLPA problrı, PCR reaksiyonunda hızla amplifiye edilemez ve ilgili MAPH tekniğinde olduğu gibi ayırdedilmelerine gerek yoktur. Bu nedenle bir MLPA reaksiyonu protokolü oldukça basittir.

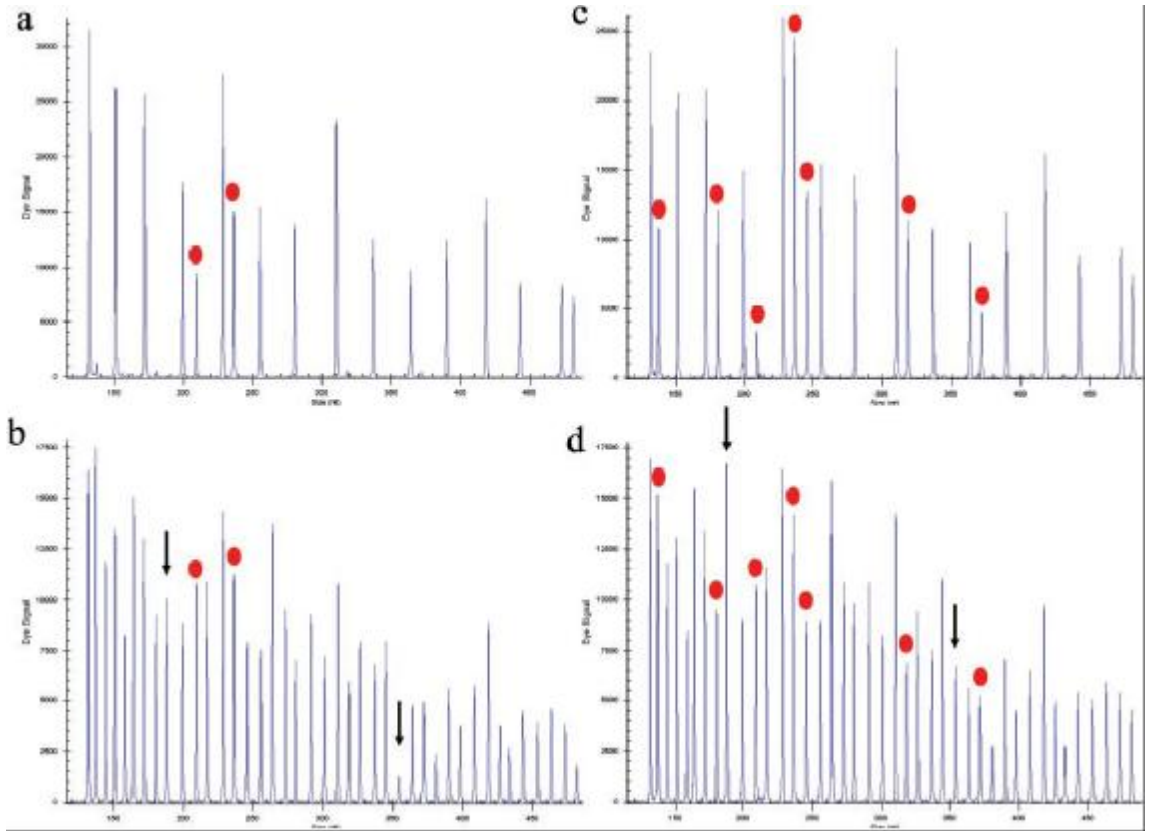
1. Bir termal cycler'da 20-500 ng DNA, 98 °C'de denatüre edilir.
2. MLPA problrı eklenir ve 60 °C'de hibridizasyona bırakılır.
3. Ligaz ve ligaz bafırı eklenir ve 54 °C'de 15 dakika ligasyona bırakılır.
4. Ligaz enzimi 98 °C'de inaktive edilir ve PCR primerleri, dNTP' ler ve polimeraz eklenerek PCR reaksiyonu başlatılır.
5. Kapiller elektroforezi ile PCR ürünleri analiz edilir.



Şekil 2.15. MLPA ile metilasyon durumunun görsel olarak belirlenmesi (Jeuken et al 2007).

2.4.2. MLPA' nın Avantajları

1. Aynı teknik çok farklı uygulamalar için kullanılabilir. Farklı testler arasındaki farklılık sadece kullanılan prob karışımıdır.
2. Multipleks: Bir reaksiyon 45' e yakın hedef dizilim hakkında bilgi sağlar. Bu bir çok uygulama için hekimler tarafından sorulan spesifik sorulara yeterli bir cevaptır.
3. MLPA reaksiyonları ucuzdur. Kitler 100 reaksiyon için yeterli miktarda polimeraz ve PCR primerleri dahil tüm reaktifleri içerir.
4. Uygulaması kolaydır. Çok sayıdaki örnek (örneğin 96 adet) aynı anda test edilebilir.
5. Hassastır. Sadece 20 ng insan DNA' sı gereklidir. Sonuçlar kullanılan örnek DNA miktarına bağlı değildir.
6. Reaksiyon üretkendir. MLPA tekniği ile, insan genomu gibi kompleks yapıda bir gen diziliminin 3'e karşı 2 kopyası gibi kopya sayısındaki küçük farklılıkları tespit edilebilir.
7. Sadece 60 nükleotit dizilimini belirler. Bu yüzden tek bir exonun delesyonunu /duplikasyonunu tespit etmede kullanılabilir. MLPA tekniği ile sadece bir nükleotitteki farklılaşan dizilimler ayırılabilir.
8. Düşük yatırımlıdır. MLPA tekniği için gerekli olan bir termocycler ve DNA dizilimini saptayan elektroforez aleti bir çok moleküler biyoloji laboratuvarında mevcuttur. Tercih edilen kapiller elektroforezdir, fakat ABI373 ve 377 slab jeller de kullanılmaktadır (SALSA 2008).



Şekil 2.16. Fragman analizi sonucu ortaya çıkan pik görüntüleri ile görsel olarak değişiklikler tespit edilebilir. Ayrıca elde edilen size ve area değerleri kullanılarak çeşitli analiz programları ile doğrulaması yapılabilir (Nygren A.O.H, 2005).

Şekil 2.16’da MLPA P041A prob karışımı kullanılarak Acute Myeloid eukemia(AML) hücre hatlarında anormal metilasyon kalıplarının saptanması görülmektedir. Şekillerde sırayla aşağıdaki gibi yorumlama yapılmaktadır.

a) AML hücre hattına ait p15 (211 bp) ve p73 (238 bp) (kırmızı işaretli) genlerinin % 50 metilasyon gösteren CE-kalıp. Diğer bütün MS-MLPA problemlerinin yokluğu kesim reaksiyonun % 100 etkisini işaret etmektedir.

b) HhaI işlemi uygulanmayan, CE-kalıp olarak aynı hücre hattı (a’da gösterildiği gibi), metilasyon seviyelerini ölçülmesi için kesilmeyen pik uzunluklarının kullanıldığını

göstermektedir. Kontrol DNA örnekleri ile karşılaştırıldığı zaman, siyah oklarla gösterildiği gibi MEN1 ve HIC1 promotorları için spesifik düşmüş prob sinyalleri gözlenmektedir ki bu genlerin kopya sayısındaki azalmayı işaret etmektedir (şekil b deki 193 ve 355 bp fragmanlar) . MEN1 ve HIC1 promotorları için spesifik beklenen normal prob sinyalleri siyah oklarla şekil d de tarif edildiği gibidir.

c) AML hücre hattına ait CE kalıp, birçok gende metilasyon göstermektedir, örneğin; TIMP-3 (142 bp), KLK10(184 bp), p15 (211 bp), p73 (238 bp), CDH13 (247 bp), IGSF4 (319 bp) and ESR1 (373 bp) (kırmızı işaretli).

d) Aynı hücre hattından CE kalıbı (şekil c'de gösterildiği gibi) fakat HhaI işlemi uygulanmamış (Nygren A.O.H, 2005).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Çalışılacak Doku Örneklerinin Temini

Çalışmamızda kullanılan doku örnekleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim dalı arşivlerinden elde edilmiştir. Bu çalışmada farklı tip ve tanı konulmuş hastalardan alınan parafine gömülü kalın bağırsak dokuları kullanılmıştır. Farklı yaş ve cinsiyet gruplarından 70 hastaya ait parafine gömülü doku örnekleri kullanılmıştır. Bu doku örnekleri kalın bağırsağın sağ ve sol kolon, rektum, sigmoid kolon, çekum, transvers kolon bölgelerinden farklı patolojik özelliklerde dokulardan oluşmaktadır. Kontrol grubu için ise sağlıklı bireylerden alınan periferal kan örneklerinden izole edilen DNA örnekleri kullanılmıştır. Bu dokularla ilgili cinsiyet, yaş ve tanı bilgileri Çizelge.3.1 de gösterilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Yapılan çalışma 5 basamakta gerçekleşmiştir. Bu basamaklar sırası ile,

- Doku örneklerinden parafinin uzaklaştırılması
- Dokudan DNA izolasyonu
- MLPA PCR reaksiyonu
- Kapiller elektroforezde fragman analizi sonuçları
- Analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

Bu basamaklarda yapılan işlemler metod kısmında detayları ile anlatılmıştır. Bu kısımda basamakların her birinde kullanılan sarf malzemeleri ve cihazlar belirtilmiştir.

10'ul luk pipet ucu DNase free	(AHN,ALMANYA)
100'ul luk pipet ucu DNase free	(AHN,ALMANYA)
1000'ul lik pipet ucu DNase free	(AHN,ALMANYA)

Pipet takımı	(Thermo,ALMANYA)
Vortex	(Medline,ABD)
Santrifüj	(Thermo,ALMANYA)
Steril distile su	(Vivantis,MALEZYA)
PCR cihazı	(ABI 2700,ABD)
2 ml ependorf tüp	(AHN,ALMANYA)
1.5 ml ependorf tüp	(AHN,ALMANYA)
0.2 ml PCR tüpü	(AHN,ALMANYA)
Etüv	(Nüve.Türkiye)
Isıtıcı blok (Kuru blok)	(Thermo,ALMANYA)
Mikrosantrifüj	(Thermo,ALMANYA)
Mini Spin	(Merc,ALMANYA)
Kapiller Elektroforez(Sekans cihazı)	(ABI 310,ABD)
Kapiller (Uzunluk 47 cm, çap 50µm)	(ABIGenetic Analyser,ABD)
Ksilol	(Merc,ALMANYA)
Mutlak Etanol	(Merc,ALMANYA)
DNA çalışma kabı	(Vivantis,MALEZYA)
Ependorf chiller	(Vivantis,MALEZYA)
PCR chiller	(Vivantis,MALEZYA)
DNA İzolasyon kiti	(Fujiilm,JAPONYA)
QuickGene Mini80	(Fujiilm,JAPONYA)
Spektrofotometre	(Nanodrop,ABD)
Deep-freeze	(Uğur,TÜRKİYE)
Buzdolabı	(Arçelik,TÜRKİYE)
Salsa MLPA ME011 Probe Mix	(MRC,Holland)
Gene Scan Liz 500 Internal Size Standart	(ABI,ABD)
Hi-Di Formamide	(ABI,ABD)
Mineral Yağ	(Advalytix,ALMANYA)
Hha1 Restriksiyon enzimi	(Vivantis,MALEZYA)

Çizelge 3.1. Çalışılan olgulara ait patolojik veriler

Olgu No	Cinsiyet	Yaş	Tanı
1	E	67	Adenokarsinom
2	K	71	Adenokarsinom
3	K	85	Adenokarsinom
4	E	51	Adenokarsinom
5	E	48	Adenokarsinom
6	E	68	Adenokarsinom
7	K	84	Adenokarsinom
8	E	69	Adenokarsinom
9	K	55	Adenokarsinom
10	E	75	Adenokarsinom
11	E	75	Adenokarsinom
12	K	65	Adenokarsinom
13	E	60	Adenokarsinom
14	E	57	Adenokarsinom
15	K	71	Adenokarsinom
16	K	75	Adenokarsinom
17	E	66	Adenokarsinom
18	E	56	Adenom
19	E	56	Adenom
20	E	64	Adenom
21	E	64	Adenom
22	E	62	Adenom
23	E	62	Nöroendokrinkarsinom
24	E	47	Adenom
25	K	78	Adenokarsinom
26	E	37	Adenom
27	E	37	Adenom
28	K	45	Adenokarsinom
29	K	45	Adenom(Hamartömatöz polip)
30	K	45	Adenom(Hamartömatöz polip)
31	E	35	Adenom
32	E	35	Adenom
33	K	63	Adenokarsinom
34	K	63	Adenom
35	E	46	Adenom(polip)
36	E	46	Adenokarsinom
37	E	49	Karsinom
38	E	49	Tubuler Adenom
39	E	49	KarsinomLenf
40	E	32	Adenom High grade displazi
41	E	32	Adenom
42	E	47	Karsinom X kodlu
43	E	47	Karsinom Y kodlu

Çizelge 3.2. Devamı, Çalışılan olgulara ait patolojik veriler

Olgu No	Cinsiyet	Yaş	Tanı
44	E	47	Adenom
45	E	64	Adenom(Hiperplastik polip)
46	E	64	Adenom(Displazili Hiperplastik polip)
47	E	47	Adenom
48	K	52	Adenokarsinom
49	K	75	Adenokarsinom
50	K	72	Adenokarsinom
51	K	56	Adenokarsinom
52	K	56	Adenokarsinom
53	E	70	Adenokarsinom
54	E	57	Adenokarsinom
55	E	59	Adenokarsinom
56	E	76	Adenokarsinom
57	E	60	Adenokarsinom
58	E	74	Adenokarsinom
59	E	50	Adenokarsinom
60	K	54	Adenokarsinom
61	K	38	Adenokarsinom
62	K	56	Adenokarsinom
63	K	58	Adenokarsinom
64	K	65	Adenokarsinom
65	K	40	Adenokarsinom
66	K	73	Adenokarsinom
67	K	57	Karsinom
68	K	57	Adenokarsinom
69	K	65	Adenokarsinom
70	K	72	Adenokarsinom

3.1.3.Dokulardan Parafinini Uzaklaştırılmasında Kullanılan Solüsyonlar

Xylol

Alkol % 99.5

Alkol %85

Alkol %70

Alkol %40

Steril distile su

3.1.4. MLPA yöntemi için kullanılan solüsyonlar

SALSA Probe-mix	(MRC-Holland,HOLLANDA)
MLPA buffer	(MRC-Holland,HOLLANDA)
Ligase-Buffer A	(MRC-Holland,HOLLANDA)
Ligase-Buffer B	(MRC-Holland,HOLLANDA)
Ligase 65 enzyme	(MRC-Holland,HOLLANDA)
Salsa Primer	(MRC-Holland,HOLLANDA)
Salsa Enzyme Dilution buffer	(MRC-Holland,HOLLANDA)
Salsa Polymerase	(MRC-Holland,HOLLANDA)
Salsa PCR buffer	(MRC-Holland,HOLLANDA)
BstHH I (HhaI Enzimi)	(Vivantis,MALEZYA)

3.1.5. BstHH I (Hha I) Restriksiyon Endonükleaz

Haemophilus haemolyticus bakterisinden elde edilen bir restriksiyon endonükleaz enzimidir.

Kullanılan kesim enziminin metilasyon duyarlı olması, tanıma bölgesindeki metilasyon durumuna bağlı olarak kesim durumunu değiştirmektedir. Kullanılan kesim enziminde

1 µl de 40 ünite enzim bulunmaktadır. Enzim 49 °C de maksimum verimde çalışmaktadır. Bu nedenle uygula basamaklarında kesim aşaması da gerçekleşmiştir.

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

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

Şekil 3.17. HhaI enziminin tanıma bölgesi CG dizisidir. Bu dizisi genellikle genomda CpG adacıklarında lokalizedir.

Enzim metilasyon duyarlı çalışma mekanizmasına sahiptir. Tanıma bölgesinde metilasyon durumu olduğunda enzim kesim gerçekleştirmez.

3.1.6. MLPA ME011 Kit Problemleri ve Özellikleri

Çalışmamızda kullandığımız ME011 kitinde SALSA Probe-mix içerisinde Çizelge.3.2.gösterilen problemler bulunmaktadır. Bu problemler hedef gen bölgelerine hibridize olacak olan sentetik problemlerdir. Ayrıca bu problemlerin içinde reaksiyonun durumunu yorumlamaya yarayan ve metilasyon analizinde kullanılacak kontrol ve referans problemler bulunmaktadır.

MLPA PCR aşamasında kullanılan problemlerin amplifikasyonunu sağlayan SALSA primerlerinin dizileri aşağıdaki gibidir. Bu primerlerden forward primer floresan işaretli, reverse primer ise işaretlidir. Primerlerden birinin floresan işaretli olması Sekans cihazındaki lazer okuyucunun ampliconları okumasını sağlamaktadır.

SALSA PCR Forward primer (Floresan İşaretli):

*GGGTTCCCTAAGGGTTGGA

SALSA PCR Reverse primer (Floresan İşaretli Değil):

GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA

Çizelge 3.3. Hedef gen bölgelerine hibride olan sentetik MLPA problemleri ve özellikleri

Uzunluk	Salsa Mlpa Problemleri	Hha I Bölgesi	Saptanan Gen	Kromozom pozisyonu
64-70-76-82*	DQ-control fragments			
88-92-96**	DD-control fragments			
136	Probe 0981-L0566	-	CREM	10p12.1
142	Probe 7935-L7716	+	PMS2	7p22
148	Probe 1685-L1265	-	MLH1	3p22.1
154	Probe 4661-L4043	+	PMS2	7p22
160	Probe 6228-L5731	+	MSH6	2p16
166	Probe 1686-L1266	+	MLH1	3p22.1
175	Probe 0554-L0123	-	TNFRSF1A	12p13.31
184	Probe 6227-L7711	+	MSH2	2p21
193	Probe 5670-L5146	+	MGMT	10q26
198	Probe 6222-L7712	+	MLH1	3p22.1
202	Probe 1245-L0793	-	MLH3	14q24.3
209	Probe 6230-L5733	+	MSH6	2p16
220	Probe 7940-L7721	+	MSH3	5q14.1
229	Probe 2334-L1820	-	PAH	12q23
237	Probe 7187-L7710	+	MLH1	3p22.1
246	Probe 0911-L0499	-	MSH2	2p21
256	Probe 0587-L0382	-	BCL2	18q21.3
265	Probe 6221-L1747	+	MLH1	3p22.1
274	Probe 6142-L0599	+	MSH2	2p21
283	Probe 7938-L7719	+	MSH3	5q14.1
292	Probe 2258-L1745	+	MLH1	3p22.1
301	Probe 6229-L5732	+	MSH6	2p16
310	Probe 3184-L2523	-	CDK6	7q21.3
319	Probe 7188-L5144	+	MGMT	10q26
328	Probe 7934-L7715	+	PMS2	7p22
337	Probe 2416-L1862	-	CDH1	16q22.1
346	Probe 7939-L7720	+	MSH3	5q14.1
355	Probe 7941-L7722	+	MLH3	14q24.3
364	Probe 1234-L0781	-	AI651963	10p14
373	Probe 2239-L1261	+	MGMT	10q26
382	Probe 0973-L0560	-	NET-7	10q22
400	Probe 6141-L2162	+	MSH2	2p21

* 100 ng DNA miktarından daha düşük değerlerde pik görüntüsü oluşturur

**Hibridizasyon öncesinde DNA denatürasyonu eksik gerçekleştiğinde düşük pik oluşur.

Çizelgedeki veriler problemlerle ilgili şu bilgileri vermektedir.

Uzunluk : Problemlerin sekans uzunluğunu bildirmektedir.

Salsa MLPA Problemleri : Sentetik olarak üretilen problemlere verilen kod numaraları

HhaI Bölgesi : Metilasyon duyarlı kesim enzimi bölgesi bulunduran prob,

+ ; kesim bölgesi var

- ; kesim bölgei yok

Saptanan Gen : Analizini yaptığımız genler

Kromozom pozisyonu: Problemlerin spesifik genlerinin kromozom lokalizasyonu

3.2. METOD

Memeli dokularından DNA ekstraksiyon işleminde bir çok laboratuvarında klasik olarak uygulanan dokudan DNA ekstraksiyon işlemleri uygulanmaktadır. Fakat parafin bloktan DNA ekstraksiyon işleminde ekstra tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Parafine gömülü dokulardan DNA eldesi, parafine gömülü olmayan taze veya eski dokulara göre daha zor olmaktadır. Bu nedenle dokudan en yüksek miktar ve kalitede DNA elde etmek için ekstraksiyon işlemine başlamadan bazı uygulamaları dikkatle ve hassasiyetle uygulamak gerekmektedir.

Parafin maddesi maden kömüründen elde edilen mumsu yapıda bir yağdır. Uzun süre saklanacak olan doku örneklerinin bozulmadan korunması için kullanılmaktadır. Nükleik asit ekstraksiyon işlemlerinde ilk olarak parafinin dokudan uzaklaştırılması gerekiyor. Doku parçalarının yıkanması ile parafin uzaklaştırılmaktadır. Bu işlem için sırasıyla ksilol(ksilen), steril distile su, alkol kullanılmaktadır.

Doku örneklerinden parafini uzaklaştırmak için önerilen çok çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Araştırmacılar tarafından tavsiye edilen ve uygulanmış olan bütün farklı yöntemlerde temel hedef aynı olup, bazı detaylarda farklılıklar bulunmaktadır.

Bu çalışmada araştırmacılar tarafından uygulanan ve önerilen bütün yöntemlerden istifade ederek, ekstraksiyon aşamasındaki basamakları da hesaba katarak kendimize ait bir yöntem uyguladık.

3.2.1. Dokuların Hazırlanması

Dokuların hazırlanmasında her bir örnek için tezgah üzerine kağıt havlu serildi. Bu kağıt havlunun üzerine dörtte biri kadar aliminyun fölye kağıt havlunun ortasına yerleştirildi. Aliminyun fölye ortasına da bir tane lam yerleştirildi ve dokulardan istenilen ebatlarda ince kesit alınması işlemi gerçekleştirildi. Lam üzerinde yan olarak yatırdığımız bloğun taban kısmında steril bistüri ve steril bistüri uçları ile çok ince

kesitler alındı. Bu işlem esnasında mümkün olabildiği kadar bloğu bir boydan bir boya bistürinin ucunu hiç kaldırmadan en uzun kesitler alacak şekilde uygulandı.

Bu işlemde özellikle bir basamağa özen gösterildi. Küp şeklindeki ya da dikdörtgenler prizması şeklindeki parafin bloklarda bulunan doku parçaları genellikle bloğun taban kısmına yerleşmiş şekilde tutuluyordu. Bloğun tamamen içerisine yerleşmeyen doku parçaları dış ortamla temas etmekteydi. Blokların hazırlanma koşullarını göremediğimiz için ve transportu esnasında birçoğu aynı kutu içinde taşınması nedeniyle muhtemel kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için parafin bloğun önce dokunun dış yüzeye yakın kısmından yani taban kısmından başlamak üzere bistüri ile tüm yüzeyleri sıyrıldı. Bu işlem yapılırken iki defa bistüri ucu değiştirildi. Bloğun tüm yüzeyleri tamamen sıyrıldıktan sonra lam ve aliminyum fölye atıldı. Yerine tekrar yeni aliminyum fölye ve lam yerleştirildi. Ayrıca bistüri ucu tekrar değiştirildi. Bütün bu işlemler için toplam üç kez bistüri ucu değiştirildi.

Elde edilen ince kesitler arasından görsel olarak belirlenen en ince doku kesitlerinden yaklaşık 10-50 mg arasında değişen ağırlık aralığında hassas terazi ile ölçülerek 2 ml lik ependorf tüplere konuldu. Hassas terazi ile ölçüm sırasında terazinin üzerine aliminyum fölye yerleştirildi ve her tartım işleminden sonra aliminyum fölye değiştirildi. Tüplerin kapaklarına ve yan yüzeylerine silinmeyen cam kalemle hastalara verdiğimiz numaralar yazıldı.

3.2.2.Parafinin Uzaklaştırılması

2 ml lik ependorf tüplere 10 – 50 mg arasında ince kesitleri halinde doku örnekleri yerleştirilerek sonraki basamak için bütün doku örnekleri hazırlandı. Parafinin uzaklaştırılması hazırlanan bu tüpler içerisinde gerçekleştirildi. Dokulardan parafinin tamamen uzaklaştırılmasında zor bir uygulama gerektirmektedir. Parafinin tamamen uzaklaştırılması sonuçların verimini artırmak için son derece önemli bir süreçtir.

Bu işlemler için ksilol(ksilen), alkol, steril distile su ve serum fizyolojik kullanıldı.

Sırası ile aşağıdaki basamaklar uygulandı;

Ksilol İle Yıkama

1. 2 ml lik ependorf tüplerin içerisine 1200 µl ksilol eklendi, tüpler elle birkaç defa elle alt üst edildi, ardından vorteks ile hafif hızla karıştırıldı ve 56 °C de bir gece etüvde inkübe edildi.
2. Bir gece inkübasyondan sonra mikrosantrifüjde 12000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tüpün dibinde hiç sıvı kalmayacak şekilde tüpten atıldı.
3. Tüplerin içerisine ikinci defa ksilol eklendi. Fakat bu kez 1000 µl ksilol eklendi, tüpler elle birkaç defa elle alt üst edildi, ardından vorteks ile hafif hızla karıştırıldı. Etüvde 70 °C de 30 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda 12000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tüpün dibinde hiç sıvı kalmayacak şekilde tüpten atıldı.
5. Tüplerin içerisine üçüncü kez, bir önceki basamakta olduğu gibi 1000 µl olarak ksilol eklendi, tüpler elle birkaç defa elle alt üst edildi, ardından vorteks ile hafif hızla karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
6. 12000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tüpün dibinde hiç sıvı kalmayacak şekilde tüpten atıldı.

Su İle Yıkama

7. Tüplerin içerisine 1000 µl steril distile su, tüpler elle birkaç defa elle alt üstü edildi, ardından vorteks ile hafif hızla karıştırıldı. 37 °C de 30 dakika inkübe edildi.
8. 12000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tüpün dibinde hiç sıvı kalmayacak şekilde tüpten atıldı.
9. Aşırı eskimiş ve deforme olmuş dokuların oluşu tüplere 1000 µl serum fizyolojik eklendi ve 37 °C de etüvde bir gece inkübe edildi(Diğer örneklere onbirinci basamaktan itibaren işlemler beklemeden uygulandı).

10. 12000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tüpün dibinde hiç sıvı kalmayacak şekilde tüpten atıldı.

Alkol İle Yıkama

11. Tüplerin içerisine % 40 lık alkolden 1000 µl eklendi. Tüpler birkaç defa elle alt üst edildi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

12. 12000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tüpün dibinde hiç sıvı kalmayacak şekilde tüpten atıldı.

13. Son iki basamakta yapılan işlemler %70, % 85 ve % 99.5 alkoller ile aynı şekilde tekrar edildi.

14. Tüplerin ağzı açık bırakılarak alkolün tamamen uçması ve dokuların kuruması sağlandı.

3.2.3. DNA Ekstraksiyonu

Parafinden ve alkolden arındırılan doku parçaları DNA ekstraksiyonu için hazır hale geldi. Kitin içerisindeki kimyasallar ile lizis işlemleri başlatıldı.

- 180 µl MDT buffer ve 20 µl Proteinase K her bir tüpe eklendi ve 55 °C de bir gece inkübe edildi.
- Bir gece inkübasyondan sonra 10000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı steril 1,5 ml lik ependorflara aktarıldı. Şayet santrifüj sonunda tüpün dibinde hala erimeyen doku parçaları kaldı ise lizis işlemi 180 µl MDT buffer ve 20 µl Proteinaz K ile tekrar edildi. Bu lizis aşamasında 120 dakika inkübasyon yapıldı.
- Bir gece inkübasyondan sonra tekrar 10000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant farklı steril 1,5 ml lik ependorflara aktarıldı.
- 1,5 ml lik ependorflara aktarılmış olan lizatlara 180 µl LDT buffer eklendi ve 70 °C de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda 240 µl mutlak alkol eklendi. Vortekle karıştırıldı. Bu işlem sonunda lizat tamamen hazır hale geldi.

- Lizata yarı otomatik QuickGene Mini80 cihazında yıkama ve elüsyon işlemleri uygulanarak 200 µl elüsyon tamponu içerisinde DNA izole edildi.

3.2.4. MLPA Reaksiyonları

MLPA reaksiyonları 3 aşamada tamamlandı. Bu aşamalarda hibridizasyon, ligasyon(ligasyon kesim), PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Bu reaksiyonlarda kullanılan bütün solüsyonlar aşağıdaki basamaklarda bir örnek üzerinden miktarları yazıldı.

3.2.4.1. Hibridizasyon

- 0,2 ml lik PCR tüplerinin içerisine her DNA örneğinden 5 µl eklendi
- PCR cihazında 98 °C de 10 dakika denatüre edildi
- İnkubasyon sonunda sıcaklık 25 °C ye düşürüldü.
- Her bir tüpe 1,5 µl SALSA prob miks ve 1,5 µl MLPA tamponu eklendi, pipetaj yapıldı.
- 1 dakika 95 °C de denature edildi ve 60 °de 16 saat inkübasyona bırakıldı

3.2.4.2. Ligasyon , Ligasyon+Kesim

- 16 saat hibridizasyondan sonra cihaz 25 °C ye düşürüldü.
- Oda sıcaklığında her bir tüpe 3 µl Ligase Buffer A ve 10 µl steril distile su eklendi, yeteri kadar pipetaj yapıldı.
- Örnek sayısınca yeni PCR tüpleri hazırlandı ve olgu numralarına göre renkli cam kalemi işaretlendi.
- 10 µl sıvı yeni hazırlanan PCR tüplerine aynı olgu numaralarına dikkat edilerek aktarıldı. Bu şekilde sadece ligasyon reaksiyonunun gerçekleşeceği örnekler ile ligasyon ve kesim reaksiyonunun gerçekleşeceği örnekler hazırlandı.
- Bütün PCR tüpleri PCR cihazına yerleştirildi.

- 49 °C de bir dakika inkübe edildi, hemen ardından 49 °C de bekleyecek şekilde cihaz durduruldu.
- Sadece ligasyon reaksiyonu gerçekleşecek olan tüplere Ligase 65 karışımı eklendi.
- Ligasyon ve kesim reaksiyonu gerçekleşecek olan tüplere Ligase-Digestion karışımı eklendi

Ligase Karışımı Hazırlanması;

1,5 µl Ligase 65 buffer B + 8,25 µl su + 0,25 µl Ligase 65 enzimi yeterince pipetaj yapacak kadar karıştırılarak karışım hazırlandı.

Ligase-Digestion Karışımı Hazırlanması;

1,5 µl Ligase 65 buffer B + 8,125 µl su + 0,25 µl Ligase 65 enzimi yeterince pipetaj yapacak kadar karıştırılır ve üzerine 0,125 µl HhaI enzimi ilave edildi.

- Cihaz tekrar çalışmaya başlatılır her iki grup tüp 30 dakika 49 °C de inkübe edilir, hemen ardından 98 °C de 5 dakika denatüre edildi.
- Denatüre edildikten sonra sıcaklık cihaz 4 °C düşürüldü.

3.2.4.3. PCR

- Ligasyon ürünlerinden 5 µl alınarak yeni tüplere aktarıldı.
- 5 µl üzerine 2 µl PCR buffer ve 13 µl steril distile su ilave edildi, pipetaj yaparak karıştırıldı ve PCR soğuk bloğunun üzerine yerleştirildi.
- Tüpler soğuk blok(PCR chiller) üzerinde iken 5 µl Polymerase karışımı ilave edildi.
- Polimeraz karışımı ilave edildikten sonra , önceden 72 °C de ısıtılmış olan PCR cihazına hızlıca tüpler yerleştirildi ve PCR reaksiyonu başlatıldı.

Polymerase Karışımı Hazırlanması;

1 µl PCR primerleri + 1 µl + Enzim Sulandırma tamponu + 2,75 µl steril distile su eklenip karıştırıldı. Karışımın üzerine 0,25 Polimeraz enzimi ilave edildi.

PCR Koşulları ;

30 saniye 95 °C, 30 saniye 60 °C, 60 saniye 72 °C ; 35 siklus

20 dakika 72 °C inkubasyon

- PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra PCR ürünleri floresans işaretli primerlerle çoğaltıldı. Işık primerlere zarar vermektedir, bunu önlemek PCR tüpleri alüminyum folye ile sarıldı ve -20 °C ye kaldırıldı.

3.2.4.4. Kapiller Elektrophorez ile Yürütme

- Elde edilen MLPA PCR ampliconlarından 1µl örnek
- 11,25 formamide
- 0,75 size standart

karışımı kapiller elektrophorez cihazının septa kapaklı tüplerine ilave edildi. Sekans cihazının yürütme sistemi uygulandı. Bu yürütmede kapiller elektrophorezinde fragman analizi yapıldı.

3.2.5. İstatistiki Değerlendirme Metodu

Elde edilen veriler Student t-testi ve Ki-kare testi kullanılarak anlamlılık düzeyi olarak $\alpha= 0.05$ alınarak hesaplandı. Hesaplamalar SPSS 17 programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. İzole Edilen Doku DNA' larının Spektrofotometre İle Ölçüm Değerleri

Çalışmamızda kullanılan parafine gömülü olan dokulardan izole edilen DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri yapıldı. Spektrofotometrik ölçümlerle nükleotidlerin saflığı, kirlilik miktarı, protein varlığı saptanabilmektedir. Nükleotidler 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği göstermektedir. Bu nedenle 260 nm dalga boyunda ölçülen absorpsiyon değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır.

260 nm ve 280nm dalga boylarındaki okunan değerlerin, 260nm/280nm oranı nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. A260/A280 oranı 1.75-1.8' in üzerindeki değerlerde saflaştırılmış DNA varlığından bahsedilir.

Bu ölçüm sonucunda DNA saflığı için optik dansite değerleri (260/280) ve 1 µl'deki DNA nanogram olarak ağırlıkları Çizelge.4.1. de verildi.

MLPA uygulamalarında her reaksiyon için gerekli duyulan DNA miktarı 20-200 ng olarak belirlenmiştir. Her örnekten bir MLPA reaksiyonu için 5 µl kullanılmaktadır.

Kullanılan bütün örneklerde DNA miktarı en alt limit olarak belirlenen 20 ng / 5 µl değerinin üzerindedir. Elde ettiğimiz DNA miktarlarının MLPA çalışması için yeterli olduğu görülmektedir. Çalışmamızda her DNA örneğinden bir MLPA reaksiyonu için 5 µl kullanıldı.

Çizelge 4.1. DNA izolasyonu sonucu elde edilen absorbans değerleri (260/280 nm)

OLGU NO	O.D. 260/280 nm	ng/µl	OLGU NO	O.D.260/280 nm	ng/µl
1*	1.41	9.9	36	1.92	38.6
2	1.83	41.9	37	1.90	6.9
3	1.73	32.9	38	2.00	30.7
4	1.76	30.6	39	1.92	524.0
5	1.91	82.6	40	1.92	79.8
6	1.68	34.9	41**	2.06	19.0
7	1.57	12.9	42	2.00	44.1
8	1.90	74.9	43	1.79	21.9
9	1.77	41.9	44	1.79	59.7
10	1.51	14.5	45	1.93	241.9
11	1.65	27.5	46	1.92	25.1
12	1.60	25.0	47	2.00	65.2
13	1.95	127.2	48	1.96	55.2
14	1.95	92.0	49	1.92	51.2
15	1.91	54.2	50	1.97	41.4
16	1.68	38.3	51	1.87	41.3
17	1.87	142.3	52	1.90	58.0
18	1.91	59.5	53	1.86	24.5
19	1.79	24.7	54	1.97	26.1
20	1.89	388.9	55	1.85	56.2
21	2.04	207.6	56	1.73	32.4
22	1.80	20.7	57	1.79	110.6
23	1.89	106.3	58	1.75	38.3
24	1.90	29.6	59	1.69	35.9
25	1.99	832.8	60	1.88	154.0
26	1.64	19.0	61	1.81	29.8
27	1.86	37.6	62	1.80	52.5
28	1.84	31.2	63	1.80	25.7
29	1.79	13.7	64	1.85	32.2
30	1.93	298.7	65	1.85	60.3
31	1.92	26.7	66	1.82	42.9
32	1.83	19.4	67	1.80	31.8
33	1.87	37.3	68	1.97	68.7
34	1.87	46.8	69	1.80	62.5
35	2.05	90.4	70	1.93	47.5

*En düşük DNA miktarı elde edilen olgu

** En yüksek DNA miktarı elde edilen olgu

4.2. PCR Ürünlerinin Kapiller Elektroforez Sonuçları

Kontrol grubunda 4 adet ve örnek grubunda 70 adet olmak üzere toplam 74 adet DNA örneklerindeki hedef gen bölgelerine ait problemlerin sayısal değişikliklerin (copy number) ve metilasyon (methylation) sıklığının tam olarak belirlenmesi için hibridizasyon, ligasyon ve PCR basamaklarından sonra floresan işaretli primerlerle amplifiye edilen MS-MLPA PCR amplikonları kapiller elektroforez cihazında yürütüldü. Yürütmeye başlamadan önce çalışmamızda kullandığımız ME011(lot 0408) kitinin sekans cihazında GeneMapper programında paneli oluşturuldu. Bu panel kurulumu ile yürütme sonunda elde edilen pik görüntülerinden kitimize ait olan ya da bizim ilgilendiğimiz problemlerin belirlenmesi sağlandı.

Kapiller elektroforez uygulamasında, kullanılan kılcal kapillerin ince yapısı tek baz farkına sahip hedef bölgelerini bile saptayabilmektedir. Farklı uzunluklara sahip tüm hedef bölgelere ait problemler lazer okuyucu ile saptanıp, fragman analizi yapılmaktadır. Kapiller elektroforez cihazındaki her bir MS-MLPA PCR ürününe ait hedef dizilerin pik görüntüleri ve bu piklerin verdiği datalar GeneMapper programı ile her örneğin yürütülmesinden sonra belirlendi. Bu programın bize verdiği datalar önce txt uzantılı dosyalara daha sonra xls uzantılı excell verileri şekline dönüştürüldü.

Excell formatı şeklinde elde edilen datalar için pik ayıklama işlemi yapıldı. Pik ayıklamasında daha önce kitimize ait cihazın programına kurulan panelin verdiği veriler kullanıldı. Pik ayıklamasında kitin içindeki problemlere ait veriler kaydedildi. bunun dışındaki tüm pik alan değerleri ve verileri silindi. Bu şekilde her örneğe ait hem sayısal değişiklikler hem de metilasyon yürütmelerine ait veriler elde edildi.

Elde edilen piklerin alan değerleri kullanılan ME011 MMR kitinin kullanım kılavuzunda belirtilen veri analiz yöntemine göre analiz edildi (SALSA MS-MLPA kit ME011 MMR, description version 08; 25-08-2008).

ME011 MMR kiti 136 ile 400 nükleotit arasında amplifikasyon ürünü veren 32 adet farklı prob içermektedir. Çizelge.4.2.'de görüldüğü gibi 11 adet HhaI restriksiyon

endonükleaz (RE) kesim bölgesi içermeyen referans probu ve 22 adet HhaI restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi içeren metilasyon spesifik prob yer almaktadır.

Kesim yapılan örnekler (metilasyon spesifik analiz) için kesim bölgesi içermeyen referans problemlerinin aritmetik ortalaması alındı her bir metilasyona özgü probun pik alan değeri bu ortalama ile oranlandı ve M (metilasyon) değeri olarak belirlendi.

Kesim yapılmayan örnekler (copy number) için kesim bölgesi içeren ve içermeyen tüm problemlerin pik alan değerlerinin aritmetik ortalaması alınarak her bir probun pik alanı değeri ile oranlandı ve CN (copy number) değeri olarak belirlendi.

Her bir prob için elde edilen M ve CN değerleri oranlanarak her bir probun metilasyon oranı bulundu. Aynı gene ait farklı değerlerin ortalaması alındı. Bu uygulama kontrol ve örnekler olmak üzere bütün veriler için uygulandı. Bu şekilde her kontrole ve her örneğe ait bütün problemlerin tek tek oranları elde edildi.

Elde edilen kontrol grubu metilasyon oranlarının ortalaması örneklerden elde edilen değerler için eşik değer olarak belirlendi. Örneklerin her prob için saptanan metilasyon oranı ile kontrolden elde edilen değer karşılaştırılarak bütün problemlerin metilasyon durumları belirlendi.

Çizelge.4.2.'de kontrol grubuna ait DNA örneklerinin kesim yapılmış ve kesim yapılmamış PCR ürünlerinin metilasyon ve kopya sayısı verileri ile metilasyon oranları görülmektedir.

Çizelge 4.2. Kontrol grubunda genlere göre metilasyon oranları

Kesim Bölgesi	Gen Adı	Kontrol – Metilasyon (K-M)*	Kontrol – Copy Number (K-CN)**	K-M* / K-C.N.**	%M***
-	CREM	18493	21303	-	-
+	PMS2	16	6001	0.007	0.7
-	MLH1	20720	28576	-	-
+	PMS2	1268	6023	0.078	7.8
+	MSH6	582	6563	0.263	26.3
+	MLH1	1556	8999	0.073	7.3
-	TNFRSF1A	18938	21625	-	-
+	MSH2	108	5624	0.036	3.60
+	MGMT	343	4069	0.033	3.30
+	MLH1	168	3787	0.075	7.50
-	MLH3	12600	13605	-	-
+	MSH6	388	8387	0.042	4.20
+	MSH3	840	4345	0.175	17.50
-	PAH	11468	18777	-	-
+	MLH1	288	6289	0.016	1.60
-	MSH2	9591	9248	-	-
-	BCL2	10933	16696	-	-
+	MLH1	132	5016	0.037	3.70
+	MSH2	116	3725	0.284	28.40
+	MSH3	140	4119	0.583	58.30
+	MLH1	53	3722	0.009	0.90
+	MSH6	782	5750	0.068	6.80
-	CDK6	12027	14654	-	-
+	MGMT	1088	17472	0.067	6.70
+	PMS2	614	4965	0.052	5.20
-	CDH1	8919	11259	-	-
+	MSH3	14	2409	0.008	0.80
+	MLH3	77	3699	0.011	1.10
-	AI651963	9327	9008	-	-
+	MGMT	734	3231	0.156	15.60
-	NET-7	11657	14541	-	-
+	MSH2	232	4229	0.039	3.90

* K-M; Kontrol grubu metilasyon değeri

** K-CN; Kontrol grubu copy number değeri

*** %M; metilasyon oranı

Çizelge.4.3. Kontrol grubunda ve çalışma grubundaki genlere göre eşik değeri olarak belirlenen ortalama metilasyon oranları

Gen Adı	Kontrol Grubu % Metilasyon Oranları	Çalışma Grubu %Metilasyon Oranları
PMS2	4.60	65.71
MSH6	12.40	67.14
MLH1	4.20	97.14
MSH2	12.00	24.28
MGMT	8.50	82.85
MSH3	25.50	78.57
MLH3	1.10	75.71

Her bir örneğe ait tüm genlerin metilasyon yüzde oranlarının sayısal değerleri ile Çizelge 4.3'deki kontrollere ait ortalama metilasyon yüzde oranları karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonrasında kontrol grubundaki metilasyon oranından yüksek olan genlerde metilasyon var olarak değerlendirildi. Kontrol grubundaki metilasyon oranından düşük olan genlerde yok olarak değerlendirildi. Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi metilasyon var olanlar '+', metilasyon olmayanlar '-', şeklinde işaretlendi.

Çizelge 4.4. Metilasyon gözlenen genlerin olgulara göre dağılımı

No	Cinsiyet	Yaş	Tam	PMS2	MSH6	MLH1	MSH2	MGMT	MSH3	MLH3
1	E	67	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	+	+
2	K	71	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
3	K	85	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
4	E	51	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
5	E	48	Adenokarsinom	-	-	+	-	-	-	-
6	E	68	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	-	+
7	K	84	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
8	E	69	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
9	K	55	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
10	E	75	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
11	E	75	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
12	K	65	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	+	+
13	E	60	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
14	E	57	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
15	K	71	Adenokarsinom	+	-	+	-	-	+	+
16	K	75	Adenokarsinom	-	-	-	-	+	-	+
17	E	66	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
18	E	56	Adenom	-	+	+	-	+	+	+
19	E	56	Adenom	+	+	+	-	+	+	+
20	E	64	Adenom	+	+	+	+	+	+	+
21	E	64	Adenom	+	+	+	+	+	+	+
22	E	62	Adenom	+	+	+	-	+	+	+
23	E	62	Nöroendokrinka	+	+	+	-	+	-	+
24	E	47	Adenom	+	+	+	+	+	-	+
25	K	78	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	+	+
26	E	37	Adenom	+	+	+	-	-	+	+
27	E	37	Adenom	+	-	+	+	+	+	+
28	K	45	Adenokarsinom	-	-	+	+	+	+	+
29	K	45	Adenom	+	+	+	-	+	-	+
30	K	45	Adenom	+	+	+	+	+	+	+
31	E	35	Adenom	+	+	+	-	+	+	+
32	E	35	Adenom	-	+	+	-	+	-	+
33	K	63	Adenokarsinom	+	+	-	-	+	+	+
34	K	63	Adenom	+	+	-	-	+	+	+
35	E	46	Adenom(polip)	+	-	-	-	-	+	+
36	E	46	Adenokarsinom	+	+	+	-	-	+	+
37	E	49	Karsinom	-	+	+	-	+	+	+
38	E	49	Tubuler	-	+	+	-	-	+	+
39	E	49	KarsinomLenf	+	+	+	-	+	-	-
40	E	32	Adenom High	-	+	+	-	+	+	+
41	E	32	Adenom	+	-	+	-	-	-	-
42	E	47	Karsinom X	+	-	-	-	+	+	-
43	E	47	Karsinom Y	+	+	-	-	-	-	-
44	E	47	Adenom	+	-	+	-	+	+	+
45	E	64	Adenom	+	-	+	-	+	+	-
46	E	64	Adenom(Displazi	-	-	-	+	+	-	-
47	E	47	Adenom	-	+	+	-	+	-	-
48	K	52	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-

Çizelge 4.5. Devamı, Metilasyon gözlenen genlerin olgulara göre dağılımı

49	K	75	Adenokarsinom	+	+	+	-	-	-	-
50	K	72	Adenokarsinom	+	+	+	-	-	+	+
51	K	56	Adenokarsinom	-	+	+	+	+	+	+
52	K	56	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
53	E	70	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
54	E	57	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
55	E	59	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
56	E	76	Adenokarsinom	+	-	+	-	-	+	+
57	E	60	Adenokarsinom	-	+	+	+	+	+	+
58	E	74	Adenokarsinom	+	-	+	+	+	-	+
59	E	50	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
60	K	54	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
61	K	38	Adenokarsinom	-	+	+	+	+	+	+
62	K	56	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
63	K	58	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
64	K	65	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
65	K	40	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
66	K	73	Adenokarsinom	-	+	+	-	-	+	+
67	K	57	Karsinom	+	+	+	+	+	+	+
68	K	57	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
69	K	65	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	-	+
70	K	72	Adenokarsinom	+	-	-	-	+	+	+
			Metilasyon + (n)	46/70	47/70	68/70	17/70	58/70	55/70	53/70
			%Metilasyon	65.71	67.14	97.14	24.28	82.85	78.57	75.71

*n=70

Çizelge.4.4'de görüldüğü gibi kolon kanseri yönünden patolojik bulgu gösteren tüm olgularda çalışmamızda hedeflediğimiz MMR genlerinde her örnekte yüksek metilasyon oranı belirlendi. Bu sonuçlara göre en yüksek metilasyon oranı MLH1 geninde olduğu saptandı.

Çizelge 4.5 ve 4.6'da toplam 70 örneğimizin 41'i erkek (% 58.6) ve 29'u kadındır (% 41.4). Kadınların yaş ortalaması 61.76 ± 12.58 iken erkeklerin yaş ortalaması 55.02 ± 12.39 dur ($p=0.029 < 0.05$). Yaş gruplarına bakıldığında 60 yaş altı olan örnek sayısı 38 (% 54.3) ve 60 yaş ve üstü 32'dir (% 45.7). Adenokarsinom tanısı konan hastaların yaş ortalaması 61.63 ± 11.45 iken adenom için bu değer 48.91 ± 11.57 'dir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

Çizelge 4.6. Cinsiyet, yaş ve tanıya göre yaş verilerinin dağılımı ve karşılaştırılması.

Cinsiyet	n	%	Ort.	SS	t	p
Erkek	41	58.6	55.02	12.39	-2.23	0.029
Kadın	29	41.4	61.76	12.58		
Yaş						
< 60 yaş	38	54.3	48.16	7.85	-12.12	0.000
≥ 60 yaş	32	45.7	69.28	6.51		
Tanı						
Adenokarsinom	49	70.0	61.63	11.45	4.25	0.000
Adenom	21	30.0	48.91	11.56		

Çizelge 4.7’da yaş ortalamalarının metilasyona göre dağılımı verilmiştir. Genlerin tümünde yüksek ve normal metilasyona göre yaş ortamlarında anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir ($p=0.000>0.05$). PMS2 % 65.7 oranında yüksek. MSH6 % 67.1. MLH1 % 86.6. MSH2 % 24.3. MGMT % 82.9. MSH3 % 78.6 ve MLH3 % 75.7’dir.

Çizelge 4.7. Metilasyona göre yaş verilerinin dağılımı.

	Yaş Verileri					
PMS2	n	%	Ort.	SS	t	p
Yüksek	46	65.7	58.46	12.23	0.58	0.566
Normal	24	34.3	56.58	14.08		
MSH6						
Yüksek	47	67.1	57.30	12.62	-0.48	0.633
Normal	23	32.9	58.87	13.45		
MLH1						
Yüksek	62	88.6	57.58	13.04	-0.422	0.674
Normal	8	11.4	59.63	11.56		
MSH2						
Yüksek	17	24.3	56.12	11.04	-0.624	0.535
Normal	53	75.7	58.36	13.39		
MGMT						
Yüksek	58	82.9	58.19	12.16	0.536	0.594
Normal	12	17.1	56.00	16.13		
MSH3						
Yüksek	55	78.6	58.44	12.46	0.775	0.441
Normal	15	21.4	55.53	14.30		
MLH3						
Yüksek	53	75.7	58.57	12.77	0.865	0.390
Normal	17	24.3	55.47	13.07		

Çizelge 4.8’de cinsiyet ve yaş gruplarına göre tanının yüzde karşılaştırılması verilmiştir. Buna göre erkek olan hastaların % 56.1’i adenokarsinom iken kadınların % 89.7’si bu tanıya sahiptir. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($\chi^2=9.10$, $p=0.003<0.05$). Yaş gruplarına bakıldığında iki grup arasındaki fark anlamlılık sınırındadır ($p=0.059$). 60 yaş altı olanların % 60.5’i ve 60 yaş ve üstü olanların % 81.3’ü adenokarsinomdur.

Çizelge 4.8. Tanıya göre cinsiyet ve yaş gruplarının yüzdeleri.

Genler		Tanı					
		Adenokarsinom		Adenom		Toplam	
		n	%	n	%	n	%
Cinsiyet	Erkek	23	56.1	18	43.9	41	100.0
	Kadın	26	89.7	3	10.3	29	100.0
	Toplam	49	70.0	21	30.0	70	100.0
$\chi^2=9.10$, $p=0.003<0.05$							
Yaş Grubu	< 60 yaş	23	60.5	15	39.5	38	100.0
	≥ 60 yaş	26	81.3	6	18.8	32	100.0
	Toplam	49	70.0	21	30.0	70	100.0
$\chi^2=3.55$, $p=0.059>0.05$							

4.3. Cinsiyet Yönünden MMR genlerinin Metilasyon Bulguları

Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10’da erkek ve kadın hastalara ait patolojik olgularda MMR genlerinin metilasyon yüzdeleri görülmektedir.

Çizelge 4.9. Erkeklerde metilasyon yüzdeleri

Olgu	Cin.	Yaş	Tanı	PMS2	MSH6	MLH1	MSH2	MGMT	MSH3	MLH3
1	E	67	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	+	+
4	E	51	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
5	E	48	Adenokarsinom	-	-	+	-	-	-	-
6	E	68	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	-	+
8	E	69	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
10	E	75	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
11	E	75	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
13	E	60	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
14	E	57	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
17	E	66	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
18	E	56	Adenom	-	+	+	-	+	+	+
19	E	56	Adenom	+	+	+	-	+	+	+
20	E	64	Adenom	+	+	+	+	+	+	+
21	E	64	Adenom	+	+	+	+	+	+	+
22	E	62	Adenom	+	+	+	-	+	+	+
23	E	62	Nöroendokrinkarsinom	+	+	+	-	+	-	+
24	E	47	Adenom	+	+	+	+	+	-	+
26	E	37	Adenom	+	+	+	-	-	+	+
27	E	37	Adenom	+	-	+	+	+	+	+
31	E	35	Adenom	+	+	+	-	+	+	+
32	E	35	Adenom	-	+	+	-	+	-	+
35	E	46	Adenom(polip)	+	-	-	-	-	+	+
36	E	46	Adenokarsinom	+	+	+	-	-	+	+
37	E	49	Karsinom	-	+	+	-	+	+	+
38	E	49	Tubuler Adenom	-	+	+	-	-	+	+
39	E	49	KarsinomLenf	+	+	+	-	+	-	-
40	E	32	Adenom High grade displazi	-	+	+	-	+	+	+
41	E	32	Adenom	+	-	+	-	-	-	-
42	E	47	Karsinom X kodlu	+	-	-	-	+	+	-
43	E	47	Karsinom Y kodlu	+	+	-	-	-	-	-
44	E	47	Adenom	+	-	+	-	+	+	+
45	E	64	Adenom	+	-	+	-	+	+	-
46	E	64	Adenom(Displazili)	-	-	-	+	+	-	-
47	E	47	Adenom	-	+	+	-	+	-	-
53	E	70	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
54	E	57	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
55	E	59	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
56	E	76	Adenokarsinom	+	-	+	-	-	+	+
57	E	60	Adenokarsinom	-	+	+	+	+	+	+
58	E	74	Adenokarsinom	+	-	+	+	+	-	+
59	E	50	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
			Metilasyon + (n)	28/41	22/41	37/41	32/41	33/41	30/41	29/41
			%Metilasyon	68.29	53.65	90.24	70.05	80.48	73.17	70.73

*n=41

Çizelge 4.10. Kadınlarda metilasyon yüzdeleri

Olgu	Cin.	Yaş	Tanı	PMS2	MSH6	MLH1	MSH2	MGMT	MSH3	MLH3
2	K	71	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
3	K	85	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
7	K	84	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
9	K	55	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
12	K	65	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	+	+
15	K	71	Adenokarsinom	+	-	+	-	-	+	+
16	K	75	Adenokarsinom	-	-	-	-	+	-	+
25	K	78	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	+	+
28	K	45	Adenokarsinom	-	-	+	+	+	+	+
29	K	45	Adenom (Hamartömatöz)	+	+	+	-	+	-	+
30	K	45	Adenom (Hamartömatöz)	+	+	+	+	+	+	+
33	K	63	Adenokarsinom	+	+	-	-	+	+	+
34	K	63	Adenom	+	+	-	-	+	+	+
48	K	52	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
49	K	75	Adenokarsinom	+	+	+	-	-	-	-
50	K	72	Adenokarsinom	+	+	+	-	-	+	+
51	K	56	Adenokarsinom	-	+	+	+	+	+	+
52	K	56	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
60	K	54	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
61	K	38	Adenokarsinom	-	+	+	+	+	+	+
62	K	56	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
63	K	58	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
64	K	65	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
65	K	40	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
66	K	73	Adenokarsinom	-	+	+	-	-	+	+
67	K	57	Karsinom	+	+	+	+	+	+	+
68	K	57	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
69	K	65	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	-	+
70	K	72	Adenokarsinom	+	-	-	-	+	+	+
			Metilasyon + (n)	18/29	22/29	25/29	8/29	25/29	25/29	5/29
			%Metilasyon	62.06	75.86	86.20	27.58	86.20	86.20	17.24

*n= 29

Çizelge 4.11’de cinsiyete göre metilasyon yüzdelerinin dağılımı verilmiştir. Metilasyon yüzdeleri ile cinsiyet grupları arasında tüm genler için herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0.05$). PMS2 yüksek metilasyon yüzdesi erkeklerde % 68.3 iken kadınlarda % 62.1’dir. MSH6 erkeklerde % 61.0 oranında yüksek. kadınlarda % 75.9 oranında; MLH1 erkeklerde % 90.2. kadınlarda 86.2; MSH2 erkeklerde % 22.0. kadınlarda 27.6; MGMT erkeklerde % 80.5. kadınlarda % 86.2. MSH3 erkeklerde % 73.2. kadınlarda % 86.2 ve MLH3 erkeklerde %70.7. kadınlarda % 82.8’dir.

Çizelge 4.11. Cinsiyete göre metilasyon yüzdeleri.

Genler		Cinsiyet					
		Erkek		Kadın		Toplam	
		n	%	n	%	n	%
PMS2	Yüksek	28	68.3	18	62.1	46	65.7
	Normal	13	31.7	11	37.9	24	34.3
	$\chi^2=0.29$. p =0.589>0.05						
MSH6	Yüksek	25	61.0	22	75.9	47	67.1
	Normal	16	39.0	7	24.1	23	32.9
	$\chi^2=1.71$. p =0.191>0.05						
MLH1	Yüksek	37	90.2	25	86.2	62	88.6
	Normal	4	9.8	4	13.8	8	11.4
	$\chi^2=0.27$. p =0.601>0.05						
MSH2	Yüksek	9	22.0	8	27.6	17	24.3
	Normal	32	78.0	21	72.4	53	75.7
	$\chi^2=0.29$. p =0.588>0.05						
MGMT	Yüksek	33	80.5	25	86.2	58	82.9
	Normal	8	19.5	4	13.8	12	17.1
	$\chi^2=0.39$. p =0.532>0.05						
MSH3	Yüksek	30	73.2	25	86.2	55	78.6
	Normal	11	26.8	4	13.8	15	21.4
	$\chi^2=1.71$. p =0.190>0.05						
MLH3	Yüksek	29	70.7	24	82.8	53	75.7
	Normal	12	29.3	5	17.2	17	24.3
	Toplam	41	100.0	29	100.0	70	100.0
$\chi^2=1.34$. p =0.248>0.05							

Erkeklerde en yüksek oran MLH1 için %90.24 olarak bulunurken. kadınlarda MLH1. MGMT ve MSH3 için metilasyon oranları %86.20 olarak belirlenmiştir. Ayrıca kadınlarda %17.24 ile düşük oranda görülen MLH3 geni metilasyon oranı erkeklerde %70.73 ile farklılık göstermektedir. Sonuç olarak kadınlarda MSH2 ve MLH3 geni metilasyon oranları erkeklere oranla daha düşük bulunmuştur.

4.4. Yaş Yönünden MMR genlerinin Metilasyon Bulguları

Çizelge 4.12’de erkeklerde 60 yaş ve altındaki olgularda MMR genlerinin metilasyon yüzdeleri görülmektedir.

Çizelge 4.12. Yaşa göre metilasyon yüzdeleri (60 yaş ve altı)

Olgu	Cinsiyet	Yaş	Tanı	PMS2	MSH6	MLH1	MSH2	MGMT	MSH3	MLH3
4	E	51	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
5	E	48	Adenokarsinom	-	-	+	-	-	-	-
13	E	60	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
14	E	57	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
18	E	56	Adenom	-	+	+	-	+	+	+
19	E	56	Adenom	+	+	+	-	+	+	+
24	E	47	Adenom	+	+	+	+	+	-	+
26	E	37	Adenom	+	+	+	-	-	+	+
27	E	37	Adenom	+	-	+	+	+	+	+
31	E	35	Adenom	+	+	+	-	+	+	+
32	E	35	Adenom	-	+	+	-	+	-	+
35	E	46	Adenom(polip)	+	-	-	-	-	+	+
36	E	46	Adenokarsinom	+	+	+	-	-	+	+
37	E	49	Karsinom	-	+	+	-	+	+	+
38	E	49	Tubuler Adenom	-	+	+	-	-	+	+
39	E	49	KarsinomLenf	+	+	+	-	+	-	-
40	E	32	Adenom High	-	+	+	-	+	+	+
41	E	32	Adenom	+	-	+	-	-	-	-
42	E	47	Karsinom X kodlu	+	-	-	-	+	+	-
43	E	47	Karsinom Y kodlu	+	+	-	-	-	-	-
44	E	47	Adenom	+	-	+	-	+	+	+
47	E	47	Adenom	-	+	+	-	+	-	-
54	E	57	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
55	E	59	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
57	E	60	Adenokarsinom	-	+	+	+	+	+	+
59	E	50	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
			Metilasyon + (n)	25/33	22/33	30/33	4/33	26/33	26/33	24/33
			%Metilasyon	75.75	66.66	90.90	12.12	78.78	78.78	73.72

*n=33 (Yaş ortalaması 48)

Çizelge 4.13' de erkeklerde 60 yaş üstündeki olgularda MMR genlerinin metilasyon yüzdeleri görülmektedir.

Çizelge 4.13. Yaşa göre metilasyon yüzdeleri (60 yaş üstü)

Olgu	Cinsiyet	Yaş	Tanı	PMS2	MSH6	MLH1	MSH2	MGMT	MSH3	MLH3
1	E	67	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	+	+
6	E	68	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	-	+
8	E	69	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
10	E	75	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
11	E	75	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
17	E	66	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
20	E	64	Adenom	+	+	+	+	+	+	+
21	E	64	Adenom	+	+	+	+	+	+	+
22	E	62	Adenom	+	+	+	-	+	+	+
23	E	62	Nöroendokrinkarsinom	+	+	+	-	+	-	+
45	E	64	Adenom	+	-	+	-	+	+	-
46	E	64	Adenom(Displazili	-	-	-	+	+	-	-
53	E	70	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
56	E	76	Adenokarsinom	+	-	+	-	-	+	+
58	E	74	Adenokarsinom	+	-	+	+	+	-	+
			Metilasyon + (n)	10/15	10/15	14/15	6/15	14/15	11/15	12/15
			%Metilasyon	66.66	66.66	93.33	40.00	93.33	73.33	80.00

*n=15 (Yaş ortalaması 68)

Çizelge 4.14'de kadınlarda 60 yaş ve altındaki olgularda MMR genlerinin metilasyon yüzdeleri görülmektedir.

Çizelge 4.14. Yaşa göre metilasyon yüzdeleri (60 yaş ve altı)

Olgu	Cinsiyet	Yaş	Tanı	PMS2	MSH6	MLH1	MSH2	MGMT	MSH3	MLH3
9	K	55	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
28	K	45	Adenokarsinom	-	-	+	+	+	+	+
29	K	45	Adenom	+	+	+	-	+	-	+
30	K	45	Adenom	+	+	+	+	+	+	+
48	K	52	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
51	K	56	Adenokarsinom	-	+	+	+	+	+	+
52	K	56	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
60	K	54	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
61	K	38	Adenokarsinom	-	+	+	+	+	+	+
62	K	56	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
63	K	58	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
65	K	40	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
67	K	57	Karsinom	+	+	+	+	+	+	+
68	K	57	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
			Metilasyon +	6/14	12/14	14/14	7/14	14/14	13/14	11/14
			%Metilasyon	42.85	85.71	100	50	100	92.85	78.57

*n=14 (Yaş ortalaması 51)

Çizelge 4.15’de kadınlarda 60 yaş üstü olgularda MMR genlerinin metilasyon yüzdeleri görülmektedir.

Çizelge 4.15. Yaşa göre metilasyon yüzdeleri (60 yaş üstü)

Olgu	Cinsiyet	Yaş	Tanı	PMS2	MSH6	MLH1	MSH2	MGMT	MSH3	MLH3
2	K	71	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
3	K	85	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
7	K	84	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
12	K	65	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	+	+
15	K	71	Adenokarsinom	+	-	+	-	-	+	+
16	K	75	Adenokarsinom	-	-	-	-	+	-	+
25	K	78	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	+	+
33	K	63	Adenokarsinom	+	+	-	-	+	+	+
49	K	75	Adenokarsinom	+	+	+	-	-	-	-
50	K	72	Adenokarsinom	+	+	+	-	-	+	+
64	K	65	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
66	K	73	Adenokarsinom	-	+	+	-	-	+	+
69	K	65	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	-	+
70	K	72	Adenokarsinom	+	-	-	-	+	+	+
			Metilasyon +	11/14	9/14	11/14	1/14	10/14	11/14	12/14
			%Metilasyon	78.57	64.28	78.57	7.14	71.42	78.57	85.71

*n=14 (Yaş ortalaması 72)

Yaş gruplarına göre metilasyon yüzdeleri Çizelge 4.16’da verilmiştir. Cinsiyette olduğu gibi yaş grupları ile genlerin metilasyon yüzdeleri arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Sırasıyla 60 yaş altı ve 60 yaş ve üstü gruplarda yüksek metilasyon yüzdeleri şöyledir: PMS2 % 60.5 - % 71.9; MSH6 % 68.4 - % 65.6; MLH1 % 92.1 - % 84.4; MSH2 % 26.3 - % 21.9; MGMT % 81.6 - % 84.4; MSH3 % 78.9 - % 78.1; MLH3 % 68.4 - % 84.4.

Çizelge 4.16. Yaş gruplarına göre metilasyon yüzdeleri.

Genler		Yaş Grubu				Toplam	
		< 60 yaş		≥ 60 yaş		n	%
		N	%	n	%		
PMS2	Yüksek	23	60.5	23	71.9	46	65.7
	Normal	15	39.5	9	28.1	24	34.3
	$\chi^2=0.99$. p =0.319>0.05						
MSH6	Yüksek	26	68.4	21	65.6	47	67.1
	Normal	12	31.6	11	34.4	23	32.9
	$\chi^2=0.06$. p =0.804>0.05						
MLH1	Yüksek	35	92.1	27	84.4	62	88.6
	Normal	3	7.9	5	15.6	8	11.4
	$\chi^2=1.03$. p =0.311>0.05						
MSH2	Yüksek	10	26.3	7	21.9	17	24.3
	Normal	28	73.7	25	78.1	53	75.7
	$\chi^2=0.19$. p =0.666>0.05						
MGMT	Yüksek	31	81.6	27	84.4	58	82.9
	Normal	7	18.4	5	15.6	12	17.1
	$\chi^2=0.10$. p =0.757>0.05						
MSH3	Yüksek	30	78.9	25	78.1	55	78.6
	Normal	8	21.1	7	21.9	15	21.4
	$\chi^2=0.01$. p =0.933>0.05						
MLH3	Yüksek	26	68.4	27	84.4	53	75.7
	Normal	12	31.6	5	15.6	17	24.3
	Toplam	38	100.0	32	100.0	70	100.0
$\chi^2=2.41$. p =0.121>0.05							

4.5. Kanser Olgusunun Tanı Yönünden MMR genlerinin Metilasyon Bulguları

Çizelge 4.17'de adenokarsinomlu olgularda MMR genlerinin metilasyon yüzdeleri görülmektedir.

Çizelge 4.17. Adenokarsinomlu olgularda metilasyon yüzdeleri

No	Cinsiyet	Yaş	Tanı	PMS2	MSH6	MLH1	MSH2	MGMT	MSH3	MLH3
1	E	67	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	+	+
2	K	71	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
3	K	85	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
4	E	51	Ad5nokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
5	E	48	Adenokarsinom	-	-	+	-	-	-	-
6	E	68	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	-	+
7	K	84	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
8	E	69	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
9	K	55	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
10	E	75	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
11	E	75	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
12	K	65	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	+	+
13	E	60	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
14	E	57	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
15	K	71	Adenokarsinom	+	-	+	-	-	+	+
16	K	75	Adenokarsinom	-	-	-	-	+	-	+
17	E	66	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
23	E	62	Nöroendokrinkarsinom	+	+	+	-	+	-	+
25	K	78	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	+	+
28	K	45	Adenokarsinom	-	-	+	+	+	+	+
33	K	63	Adenokarsinom	+	+	-	-	+	+	+
36	E	46	Adenokarsinom	+	+	+	-	-	+	+
37	E	49	Karsinom	-	+	+	-	+	+	+
39	E	49	KarsinomLenf	+	+	+	-	+	-	-
42	E	47	Karsinom X kodlu	+	-	-	-	+	+	-
43	E	47	Karsinom Y kodlu	+	+	-	-	-	-	-
48	K	52	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
49	K	75	Adenokarsinom	+	+	+	-	-	-	-
50	K	72	Adenokarsinom	+	+	+	-	-	+	+
51	K	56	Adenokarsinom	-	+	+	+	+	+	+
52	K	56	Adenokarsinom	-	+	+	+	+	+	+
53	E	70	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	+
54	E	57	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
55	E	59	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	-
56	E	76	Adenokarsinom	+	-	+	-	-	+	+
57	E	60	Adenokarsinom	-	+	+	+	+	+	+
58	E	74	Adenokarsinom	+	-	+	+	+	-	+
59	E	50	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
60	K	54	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
61	K	38	Adenokarsinom	-	+	+	+	+	+	+
62	K	56	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
63	K	58	Adenokarsinom	+	+	+	+	+	+	+
64	K	65	Adenokarsinom	+	-	+	-	+	+	+
65	K	40	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
66	K	73	Adenokarsinom	-	+	+	-	-	+	+
67	K	57	Karsinom	+	+	+	+	+	+	+
68	K	57	Adenokarsinom	-	+	+	-	+	+	-
69	K	65	Adenokarsinom	+	+	+	-	+	-	+
70	K	72	Adenokarsinom	+	-	-	-	+	+	+
			Metilasyon + (n)	31/49	32/49	44/49	38/49	41/49	40/49	36/49
			%Metilasyon	63.26	65.30	89.79	77.55	83.67	81.63	73.46

*n=49

Çizelge 4.18’de adenomlu olgularda MMR genlerinin metilasyon yüzdeleri görülmektedir.

Çizelge 4.18. Adenomlu olgularda metilasyon yüzdeleri

	Cinsiyet	Yaş	Tanı	PMS2	MSH6	MLH1	MSH2	MGMT	MSH3	MLH3
18	E	56	Adenom	-	+	+	-	+	+	+
19	E	56	Adenom	+	+	+	-	+	+	+
20	E	64	Adenom	+	+	+	+	+	+	+
21	E	64	Adenom	+	+	+	+	+	+	+
22	E	62	Adenom	+	+	+	-	+	+	+
24	E	47	Adenom	+	+	+	+	+	-	+
26	E	37	Adenom	+	+	+	-	-	+	+
27	E	37	Adenom	+	-	+	+	+	+	+
29	K	45	Adenom	+	+	+	-	+	-	+
30	K	45	Adenom	+	+	+	+	+	+	+
31	E	35	Adenom	+	+	+	-	+	+	+
32	E	35	Adenom	-	+	+	-	+	-	+
34	K	63	Adenom	+	+	-	-	+	+	+
35	E	46	Adenom(polip)	+	-	-	-	-	+	+
38	E	49	Tubuler Adenom	-	+	+	-	-	+	+
40	E	32	Adenom High	-	+	+	-	+	+	+
41	E	32	Adenom	+	-	+	-	-	-	-
44	E	47	Adenom	+	-	+	-	+	+	+
45	E	64	Adenom	+	-	+	-	+	+	-
46	E	64	Adenom(Displazili)	-	-	-	+	+	-	-
47	E	47	Adenom	-	+	+	-	+	-	-
			Metilasyon + (n)	15/21	15/21	18/21	6/21	17/21	15/21	17/21
			%Metilasyon	71.42	71.42	85.71	28.57	80.95	71.42	80.95

*n=21

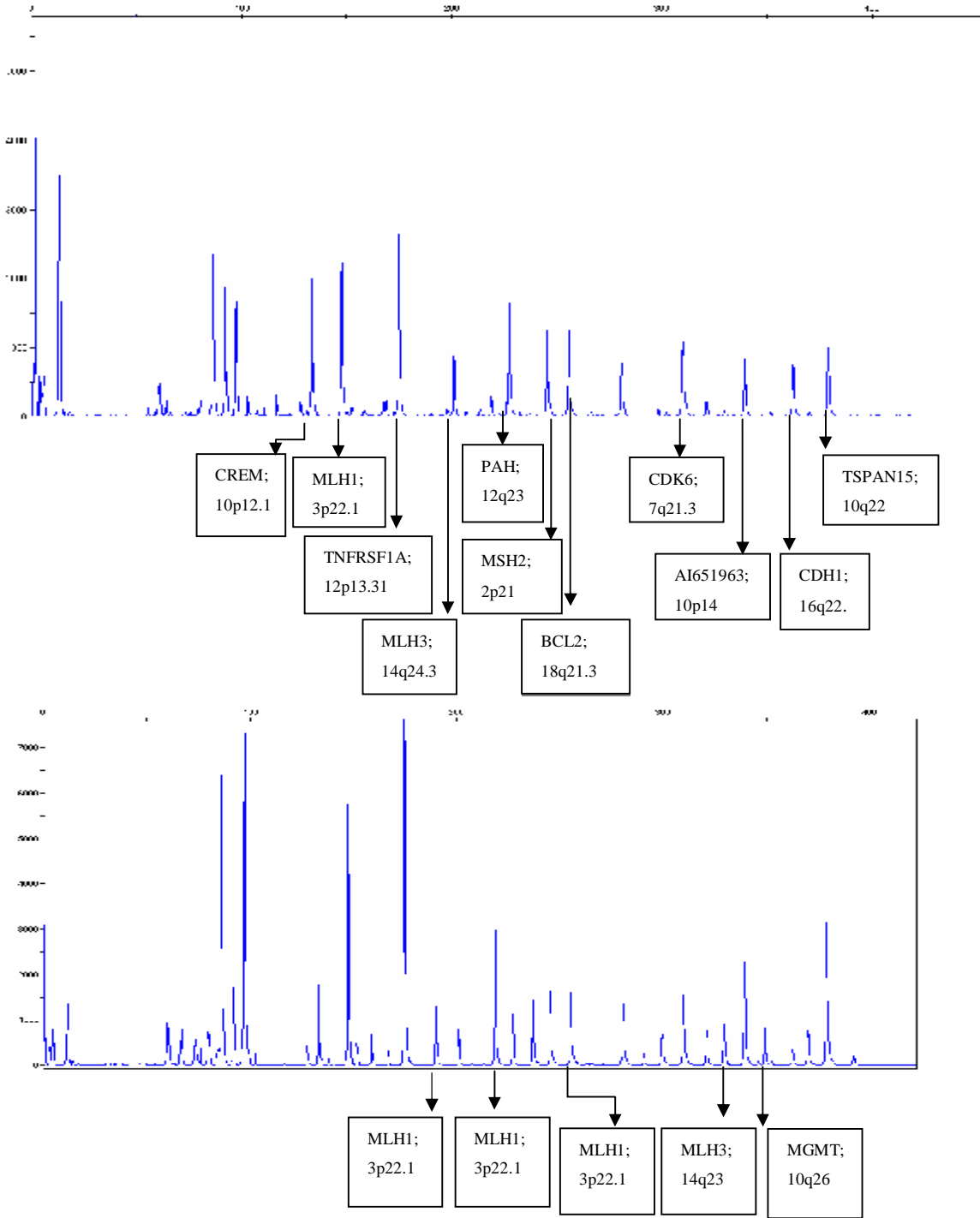
Taniya göre metilasyon yüzdeleri Çizelge 4.19’da verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır. Adenokorsinom tanıları için PMS2 % 63.3, MSH6 % 65.3, MLH1 % 89.8, MSH2 % 22.4, MGMT % 83.7, MSH3 % 81.6 , MLH3 % 73.5 olarak yüksek metilasyon tesbit edilmiştir.

Adenom tanıları için yüksek metilasyon yüzdeleri sırasıyla şöyledir, % 71.4, % 71.4, % 87.5, % 28.6, % 81.0, % % 71.4, % 81.0.

Çizelge 4.19. Tanıya göre metilasyon yüzdeleri.

Genler		Tanı					
		Adenokarsinom		Adenom		Toplam	
		N	%	n	%	n	%
PMS2	Yüksek	31	63.3	15	71.4	46	65.7
	Normal	18	36.7	6	28.6	24	34.3
	$\chi^2=0.44$. p =0.510 >0.05						
MSH6	Yüksek	32	65.3	15	71.4	47	67.1
	Normal	17	34.7	6	28.6	23	32.9
	$\chi^2=0.25$. p =0.617 >0.05						
MLH1	Yüksek	44	89.8	18	85.7	62	88.6
	Normal	5	10.2	3	14.3	8	11.4
	$\chi^2=0.24$. p =0.623 >0.05						
MSH2	Yüksek	11	22.4	6	28.6	17	24.3
	Normal	38	77.6	15	71.4	53	75.7
	$\chi^2=0.30$. p =0.584 >0.05						
MGMT	Yüksek	41	83.7	17	81.0	58	82.9
	Normal	8	16.3	4	19.0	12	17.1
	$\chi^2=0.08$. p =0.782 >0.05						
MSH3	Yüksek	40	81.6	15	71.4	55	78.6
	Normal	9	18.4	6	28.6	15	21.4
	$\chi^2=0.91$. p =0.340 >0.05						
MLH3	Yüksek	36	73.5	17	81.0	53	75.7
	Normal	13	26.5	4	19.0	17	24.3
	Toplam	49	100.0	21	100.0	70	100.0
$\chi^2=0.45$. p =0.503 >0.05							

Tanı gruplarına göre metilasyon yüzdeleri Çizelge 4.19’da verilmiştir. Cinsiyette olduğu gibi tanı grupları ile genlerin metilasyon yüzdeleri arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır (p>0.05).



Şekil 4.18. Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz kontrol grubu ve örneklerimize ait PMS2, MSH6, MLH1, MSH2, MGMT, MSH3, MLH3 genine ait pik görüntüleri.

- X eksenini; problemlerin alel değerlerine göre (bp uzunluklarını)
- Y eksenini; lazer okuyucu ile saptanan problemlerin size değerleri

Şekil 4.1’de ikinci Şekilde metillenme gözlenen MLH1, MLH3, MGMT gen bölgeleri gözlenmektedir. İlk Şekilde gözlenen pikler kontrol problemlerine ait kesim bölgesi içermeyen, pik beklediğimiz pik alanlarını işaret etmektedir. İkinci Őekildeki referans problemlerine ait piklerin dışındaki pikler metilasyon olan problemlerde kesim olmadığı için pik görüntüsü vermiŐtir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bugüne kadar tümör baskılayıcı genlerdeki epigenetik değişimlerin incelendiği birçok çalışma yapılmıştır. Bu epigenetik değişimler içerisinde en önemli çalışma sahası metilasyon olmuştur. Araştırmacıların geçmişte yoğunlaştıkları alanlar gen düzeyindeki mutasyonlar ve sonuçları iken, metilasyonun kanser genetiğindeki rolünün anlaşılması nedeniyle son yıllarda farklı kanser genlerinin metilasyon profilleri ve sonuçları üzerine yoğunlaşılmıştır. Araştırmacılar genomda metilasyon profillerindeki değişimleri incelerken birçok farklı teknik kullanmışlardır. Bu tekniklere her geçen gün yeni tekniklerin ilave edilmesiyle bu araştırma sahası geniş boyutlara ulaşmış ve birçok gendeki metilasyon değişimleri net bir şekilde tanımlanmıştır.

5.1. Parafin Bloktan DNA İzolasyonundaki Sorunlar

Moleküler Biyoloji ve Moleküler Genetik alanındaki araştırma ve tanı amacıyla yapılan bütün çalışmalarda DNA ekstraksiyonu çok önemli aşamadır. İzole edilen DNA nın miktarı özellikle de kalitesi bir sonraki basamakta yapılacak olan çalışmanın verimi için çok önemlidir. PCR, MS-PCR, Sekans, RFLP, Blotlama teknikleri, Floresans in situ hibridizasyon (FISH), Microarray ve MLPA gibi bir çok teknikte DNA kalitesi ve miktarı özellikle de DNA kalitesi çalışmanın sonucunu etkilemektedir. DNA degradasyonunu en az seviyeye çekecek ve DNA yüksek saflıkta elde edilecek metodlar uygulanmalıdır.

Parafin bloktan izole edilen DNA hem miktar hem de kalite olarak verimsizdir. Bu sonuca yapılan PCR çalışmalarının sonuçları değerlendirilerek ulaşılmıştır. Parafine gömülü dokulardan izole edilen DNA nın PCR başarısı % 65-85 civarındadır. Bunun sebeplerini şu şekilde sıralayabiliriz (Coura 2005).

1. Formaldehit;

Patoloji laboratuvarlarında yapılan arşivleme aşamalarında öncelikle doku rezeksiyonları formaldehite yatırılmaktadır. Formaldehit dokunun çürümesini ve bozulmasını engeller. Formaldehit asidik bir yapıya sahiptir. Asit özelliği ortamda mikroorganizma varlığını engellemektedir.

Formaldehitin asidik özelliği hücrelerdeki nükleik asitlere zarar verir. Özellikle uzun süre formaldehit ile muamele edilmiş olan dokularda DNA ve RNA deformasyona uğramaktadır.

2.Çapraz bağlantı (Cross-Linking);

Parafine gömülecek olan doku örneklerinin uzun süre bozulmadan patoloji arşivlerinde saklanması amaçlandığı için yüksek basınç ile sıkıştırılarak parafin maddesinin tüm hücrelere transfer olması sağlanmaktadır. Bu işlem sonrasında hücre içi biyomoleküller kros bağlantı oluşturmaktadır. DNA, proteinler, hücre içi membranlar birbirine karışarak, anormal bir yapı oluşturmaktadırlar. DNA'nın doğal yapısı değişmektedir.

5.2. MMR (Mismatch Repair) Genlerin MLPA metodu ile analizi

Çalışmamızda kolon kanseri olgularında tümörlü dokulardan izole edilen genomik DNA'nın 7 adet MMR geni (PMS2, MSH6, MLH1, MSH2, MGMT, MSH3, MLH3) yönünden metilasyon yüzdesi ve sıklığı moleküler bir test olan metilasyon spesifik MLPA yönetimi ile incelenmiştir. Elde edilen veriler cinsiyet, yaş, olgu türü gibi farklı kriterlere göre değerlendirilmiştir.

Kolon kanseri olgularında olgularımızı adenom ve adenokarsinom olarak iki farklı grupta ele aldık. Adenokarsinom olgularında MMR genlerinin metillenme oranlarının %63 ile %89 gibi yüksek bir oranda ortaya çıktığı görülmesine rağmen, adenomlu olgularda bu genlerden MSH2' de metillenme oranının daha düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17).

Metilasyon görülme sıklığı sırasıyla MLH1 için %97.14; MGMT için %82.85; MSH3 için 78.57; MLH3 için %75.71; MSH6 için %67.14; PMS2 için %65.71 ve MSH2 için %24.28 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda en yüksek oran MLH1 geninde, en düşük oran ise MSH2 geninde görülmüştür (Çizelge 4.4).

Kolorektal kanserler üzerinde yapılan bir çalışmada (Gille et al 2002), MSH2 ve MLH1 genlerinin delesyonuna bağlı olarak herediter non-polipozis kolorektal kanser bulguları ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bu çalışmamızda da MSH2 geninin özellikle adenokarsinom olgularında yüksek düzeyde etkili olduğu, MLH1 geninin metillenmesinin de her iki kanser tipinde etkili olduğu gözlenmiştir.

Cinsiyet yönünden yapılan değerlendirmede, erkeklerde en yüksek oran MLH1 için %90.24 olarak bulunurken, kadınlarda MLH1, MGMT ve MSH3 için metilasyon oranları %86.20 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, kadınlarda %17.24 ile düşük oranda görülen MLH3 geni metilasyon oranı, erkeklerde %70.73 ile farklılık göstermektedir (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6). Sonuç olarak, kadınlarda MSH2 ve MLH3 geni metilasyon oranları, erkeklere oranla daha düşük bulunmuştur.

Erkeklerde 60 yaş ve altı ile 60 yaşından daha büyük bireylerde, MSH2 geni metilasyonu yönünden fark görülmektedir. (%12.12 ve %40) (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8) MSH2 geninin metilasyon düzeyinin yaşa bağlı olarak arttığı söylenebilir.

Kadınlarda ise 60 yaş ve altı ile 60 yaşından daha büyük bireylerde, yine MSH2 geni metilasyonu yönünden fark görülmektedir (%50 ve %7.14) (Çizelge 4.9 ve Çizelge10). Kadınlarda MSH2 geninin metilasyon düzeyinin yaş artışı ile azaldığı gözlemlenmiştir.

Bir çok kanser türünde, tümör dokusunda belirlenen spesifik onkogenler, tümör baskılayıcı genlerdeki nokta mutasyonları, heterozigotluk kaybı, mikrosatellit instabilitesi, kromozomal translokasyonlar ve hipermetilasyon gibi moleküler değişiklikler hastaların önemli bir bölümünde serum veya plazmada da bildirilmiştir (Yamada 1998).

Esteller ve arkadaşları kolon, göğüs, yumurtalık, uterus, akciğer,baş-boyun, lösemi, lenfoma, beyin, böbrek, mesane, özofagus, mide, pankreas, karaciğer tanılı insan kanserlerinde susturulan 12 genin promotor bölgelerindeki hipermetilasyon oranlarını üzerine yaptıkları çalışmada kolon kanserli olgularda MGMT geninde % 39, MLH1 geninde % 44 oranında metilasyon saptamışlardır. Bizim çalışmamızda tüm olgulardaki bu iki genin oranları MLH1 % 97,14 , MGMT geni % 82,85 olarak belirlenmiştir. Her iki çalışmada da bu iki gendeki hipermetilasyon oluşumu gözlenmiştir.

Wang ve arkadaşlarının BRAF mutasyonlarının bozuk DNA hatalı eşleşme tamiri ile ilişkisi üzerine yaptıkları çalışmada MLH1 genlerinin promotor bölgesinde % 83 oranında ($p<0.0001$) hipermetilasyon oranı bildirmişlerdir. Bu duruma bağlı olarak hatalı eşleşme bozulmalarının mutasyonlar kadar, hipermetilasyon sonucu gen susturulmasına bağımlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu bizim çalışmamızdaki oranlarla ve verilerle aynı sonucu işaret etmektedir.

Toyota ve arkadaşlarının kolon kanserindeki CIMP'ler ile ilgili yaptıkları çalışmada, CIMP+ vakalarında MLH1 geninin promotor bölgesinde % 75 oranında metilasyon oranı bildirmişlerdir. Bu metilasyon oluşumuna bağlı olarak MSI oluşumunun CIMP lar tarafından stimüle edildiğini bildirmişlerdir.

Grady ve arkadaşları kolon kanserli hastaların hem tümörlü dokularından hem de aynı hastaların serumlarından elde edilen DNA larla yaptıkları çalışmada, doku DNA sında % 90 oranında MLH1 geninin promotor bölgesinde metilasyon saptamışlar, aynı hastaların serum DNA sında ise % 33 oranında MLH1 geninin promotor bölgesinde metilasyon tespit edilmiştir. Dokuda elde ettikleri sonuç bizim sonucumuzla uyumludur. Ayrıca serumda elde edilen metilasyon durumu, metilasyonun bir marker olarak kullanılabileceği hakkında fikir vermektedir.

Kolorektal ve pankreas kanserli hastaların plazmalarında klinik tanıdan önce Ras geni mutasyonları gösterilmiştir (Mulcahy 1998). Tümörün erken belirlenmesinde kullanılabilecek, potansiyeli en yüksek biyomarkerlerden biri "DNA metilasyonu" olarak gözükmektedir (Herman 1995). DNA hipermetilasyonu, mikrosatellit ve mutasyon analizi sensitiviteyi açısından karşılaştıran bir çalışma, DNA

metilasyonunun normal DNA içerisinde 1:1000 oranında bulunan tümör DNA'sını belirleyebilecek şekilde en yüksek duyarlılığı gösterdiğini bildirmektedir (Goessl 2000). Yaptığımız çalışmada da bunu destekleyici sonuçlara ulaştığımız görülmektedir.

Morak ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ailesi hikayesi olan ve aile hikayesi olmayan Lynch (HNPCC, Herediter nonpolyposis colorectal cancer) sendromu şüphesi bulunan bireylerle yaptıkları çalışmada periferal kan hücrelerindeki MLH1 geninin promotor bölgesinde hipermetilasyon olduğunu bildirmişlerdir. Aynı bireylerde normal ve tümörleri dokularında da aynı benzerlikte metilasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Ligtenberg ve arkadaşları Hollanda'lı Lynch sendromlu ailerler üzerinde yaptıkları çalışmalarda, MSH2 geninin çeşitli yöntemlerle metilasyon durumunu incelemişler, HhaI restriksiyon kesim enzimi ile kolonun çeşitli bölgelerine ait dokularda %24, %43, %22, %25, %58, %26, %13, %36, %13, %5, %20, %4, %13, %40, %14, %38, %76, %47 oranında metilasyon tesbit etmişlerdir. Bu sonuçlar bizim MSH2 (Tüm olgularda ortalama %24.28) için bulduğumuz sonuçla uyumludur.

Chan ve arkadaşları Çinli bir aile üzerinde yaptığı çalışmada cis-aktif elementinin olası yükselmesine bağlı olarak MSH2 promotorunun alele özgü karalı kalıtsal metilasyon gösterdiğini rapor ettiler.

Kane ve arkadaşları mutasyon gözlenmeyen kolorektal kanserli hastalarda, MLH1 promotor hipermetilasyon varlığını buna bağlı olarak MLH1 ekspresyonunun kaybolduğunu, buldukları bu sonucun kolon kanser patogeneğinde önemli bir rol oynadığını bildirmişleridir.

Cunningham ve arkadaşları MSI durumlu kolon kanserli olgularla yaptıkları çalışmada herhangi bir mutasyon gözlenmeyen bireylerin % 41 'inde MLH1 promotor bölgesinde metilasyon gözlemişlerdir. Bizim çalışmamıza oranla düşük olmakla beraber MLH1 de metilasyonun saptanmasının önemli olduğunu düşünüyoruz.

Herman ve arkadaşları MSI+ durumlu sporadik kolorektal kanserli olgularda % 84 oranında MLH1 geninde hipermetilasyon bulduklarını bildirmişlerdir. Bu sonuç MLH1 geni için bizim bulduğumuz sonuçla uyumludur(% 97.14).

Cunningham ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları başka bir çalışmada MSI durumlu kolorektal kanserli hastaların MLH1 genlerinde % 94 oranında protein kaybı, metilasyon ve mutasyon saptamışlardır. Bu sonuç aynı şekilde bizim çalışmamızdaki hastaların MLH1 fonksiyon kaybı ile uyumludur.

Gylling çeşitli kanserler üzerinde yaptığı çalışmada mesane, idrar yolu, böbrek, beyin, mide, kolon ve endometrium kanserlerini incelemiş ve 24 tümör süpressör genin promotor metilasyonun oranlarını karşılaştırm. Bu 24 tümör süpressör geninde en çok metilasyon gözlenen kanser tipinin kolorektal kanserler olduğunu bildirmiştir. Yine bu çalışmada incelediği bu kanser tiplerinin hepsinde MMR genlerinin hepsinde diğer kanserlere protein ekspresyonun çok yüksek seviyede düştüğünü bildirmiştir.

Kuismanen ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları MSI durumlu kolorektal kanserli hastalarda MLH1 geninde % 78 oranında protein kaybı, metilasyon ve mutasyon saptamışlardır. Bu sonuç çalışmamızdaki hastaların MLH1 fonksiyon kaybı ile uyumludur.

MspI ve HpaII modifiye restriksiyon enzimlerinin metilenmiş sitozini tanıma özgülüklerinin farklı olmasına dayandırılarak yapılan kesim çalışmalarından yararlanılarak elde ettikleri sonuçlara göre kan DNA'sı üzerinde epigenetik rolün (hipermetilasyon veya genomik imprinting) oranı %8.7 olarak, %91.3'ünde ise diğer genomik seviyede oluşan mutasyon, delesyon ve kalısal olarak aileden gelen sebeplere bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Epigenetik neden (hipermetilasyon) doku DNA'sında %17.4 oranında olduğunu tesbit etmektedirler. Elde ettikleri mevcut sonuçlara göre epigenetik değişikliklerin dokuya özgü değişiklikler olduğunu ve kanser etyopatogenezinde önemli olduğunu söylemişlerdir. (Çakar 2007).

MLPA tekniği gerek dünya gerekse ülkemiz için oldukça yeni bir tekniktir. MLPA ile yapılmış çalışmalar son 5-6 yıl içerisinde literatürde ön görölmektedir. Bu nedenle MLPA ile yapılan çalışmalarda elde edilen verilerin, karşılaşılan sorunların, yöntemin güvenilirliğinin daha net anlatılabilmesi için benzer çalışma sayılarının artması gerekmektedir.

Metilasyon ile ilgili yapılan araştırmalarda farklı teknikler kullanılarak bu araştırmalar yapılmıştır. Literatürde yayınlanan çalışmalarda en sık kullanılan MSP yöntemidir. Bu yöntemin temelindeki işlem, elde edilen DNA' nın bisüfit modifikasyonu, sitozinlerinin urasile çevrilmesidir. Metillenmiş olan sitozin ise urasile dönüşmeyecektir. Kullanılan spesifik dizayn edilmiş primerler ile amplifikasyon gerçekleşmektedir. Bu yöntemin zorlukları arasında özellikle DNA'nın bisüfit ile modifikasyon basamağının uzun sürmesi, yüksek miktarda DNA gerekliliği ve oldukça zahmetli olması sayılabilir. Bu çalışma için istenen her gen bölgesi için ayrı PCR çalışmasının dizayn edilmesi, gerek zaman, gerek işgücü, gerekse maliyet açısından bir yük oluşturmaktadır. Bununla beraber MSP' nin değerlendirilmesi agaroz jel elektroforezi hassasiyeti kadardır. Bu durum yöntemin güvenilirliğini ve etkinliğini etkilemektedir. Ayrıca MSP çalışmalarında mutlaka modifikasyonun olup olmadığının kontrolü için metile olduğu bilinen bir DNA örneğinin internal kontrol olarak çalışmada yer almalıdır. Ancak bu konuya çok özen gösterilmediğini gözlenmektedir. Bu durumun sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini etkileyeceğini düşünmekteyiz.

Diğer bir metilasyon tarama yöntemi de RealTime PCR yöntemidir. Bu yöntemde de MSP ile aynı modifikasyon basamakları takip edilir. Dolayısıyla MSP'deki olumsuz yönler bu yöntem içinde geçerlidir. Fakat güvenilirliği ve duyarlılığı MSP' ye göre yüksektir. Fakat yöntemin maliyeti oldukça yüksektir. RealTime PCR yöntemiyle bulunan metilasyon oranları diğer çalışmalara göre daha yüksek olarak bildirilmiştir.

MS MLPA yöntemi incelenecek prob bölgelerinin hibridizasyonu, hedef dizilerin ligasyonu, metilasyon spesifik HhaI ile metile olmayan bölgelerin kesimi ve kesilmeyen bölgelerin amplifikasyonu esasına dayanır. Bu yöntemle tek reaksiyonda otuza yakın gen bölgesi incelenebilmektedir. Aynı zamanda bu yöntemde aynı hastadan HhaI enzimli ve enzimsiz iki ayrı reaksiyon yapılması, probmixin içinde bulunan kontrol

pikleri, ve her reaksiyon grubunda 4 sağlıklı bireyden elde edilen DNA örneklerinin kontrol olarak değerlendirilmesi ki bu diğer yöntemlere göre bir avantaj olarak değerlendirilebilir. Aynı zamanda MS MLPA yönteminde az miktarda DNA yeterli olmaktadır. Buna ek olarak ihtiyaç duyulan teçhizat ve maliyet açısından da kabul edilebilir seviyede bir yöntemdir. Tüm bu özellikleriyle MS MLPA birçok moleküler yöntem alternatif olabilecek potansiyele sahiptir.

Çalışmamızda DNA miktarı düşük olan örneklerde saptanan pik kalitesinin değerlendirilemeyecek düzeyde olma durumu ile karşılaştık. Bazı örneklerde kapiller jel elektroforezinin ilk aşamalarında kaliteli pik elde edilirken devamında pik yüksekliğindeki düşüklükler analizlerin tekrarlanmasına yöneltti. Bu nedenle DNA miktarı ve kalitesi başarılı MS-MLPA analizi için çok önemlidir.

MS-MLPA tekniğinin hızlı bir şekilde birçok genin metilasyon profilini aynı anda incelemesi sayesinde kanserin genomik taramalarında kullanımı sağlayacaktır. Özellikle literatürlerde belirtildiği gibi kanserin erken dönemlerinde CpG adalarında meydana gelen hipermetilasyonun balgam ve kandan elde edilecek DNA örneklerine akciğer kanserinin genomik taramalarındaki önemi bilindiğinden MS-MLPA gerek kolay uygulanabilirliği, gerek sonuç alma süresinin kısalığı gerekse maliyetinin düşük olması ile bu alanda yaygın bir kullanım alanı bulacaktır. Ancak çalışmada elde ettiğimiz sonuçların literatürdeki diğer oranlara göre düşük saptanması, her genin promotor bölgesinde incelenen CpG adacık bölgeleri ile diğer çalışmalarda incelenen bölgeler arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz. Bunun yanısıra yöntemin hassasiyeti konusunda daha yüksek vaka sayılı ve yöntemin diğer yöntemlerle konfirmasyonunu içeren çalışmalara ihtiyaç olduğunu işaret etmektedir.

Bu çalışmada elde edilen kazanımların başında başarılı bir MS-MLPA çalışması için kullanılacak DNA miktarının ve kalitesinin öneminin anlaşılması gelmektedir. Parafin emdirilmiş dokulardan DNA izolasyonunda yeterli ve kaliteli DNA elde ederken çeşitli sorunlarla karşılaşmıştır. Yeterli ve kaliteli DNA eldesinin başarılı bir MS-MLPA uygulamasındaki en önemli aşama olduğu belirlenmiştir. 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.

Metilasyon sıklığının incelendiği diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında iş, zaman ve maliyet açısından MS-MLPA yönteminin diğer yöntemlere göre çok daha ekonomik olduğu gözlenmiştir. Fakat MS-MLPA'nın duyarlılığı ve hassasiyetinin belirlenmesi için geniş araştırma populasyonlarında farklı yöntemlerin aynı zamanda uygulanması ve sonuçların karşılaştırılması gerektiği görüşündeyiz.

6. KAYNAKLAR

- Akiyama, Y., Tsubouchi, N., Yuasa, Y., 1997, "Frequent somatic mutations of hMSH3 with reference to microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236, 248-252.
- Aquilina, G., Hess, P., Branch, P., MacGeoch, C., Casciano, I., Karran, P., Bignami, M., 1994, "A mismatch recognition defect in colon carcinoma confers DNA microsatellite instability and a mutator phenotype", *Proc., Nat., Acad., Sci.*, 91, 8905-8909.
- Bird, A., 2002, "DNA methylation patterns and epigenetic memory", *Genes Dev.*, 16, 6-21.
- Boer, J. De., Hoeijmakers, J., 2000, "Nucleotide excision repair and human syndromes", *Carcinogenesis*, 21, 453-460.
- Bora, G., Erdem, H., 2007, "Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları", *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38, 48-54.
- Bresalier, R.S., 2004, "Malignant neoplasms of the large intestine. Sleisenger and Fordrand's Gastrointestinal and Liver Diseases Pathophysiology / diagnosis / management", 7th Edition, Section, 10, Chapter:155.
- Chan, T.L., 2006, "Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer", *Nat. Genet.*, 38, 1178-1183.
- Cooper, D.N., 1983, "Eukaryotic DNA methylation", *Hum Genet.*, 64, 315-33.
- Corman M.L., Allison S.I., Kuehne, J. P., 2002, "Handbook of Colon & Rectal Surgery by Lippincott Williams & Wilkins 530 Walnut street Philedelphia", PA 196 USA, 423- 7.
- Correa, P., Haenszel, W., 1978, "The epidemiology of large-bowel cancer", *Adv Cancer Res*, 26, 1-141.
- Cottrell S. E., 2004 "Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology", *Clinical Biochemistry*, 37, 595- 604.
- Coura, R., Prolla, J. C., Meurer, L., Ashton-Prolla, P., *Pathol, J.C.*, 2005, "An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue", *J. Clin. Pathol.*, 58, 894-895

- Cunningham, J. M., Christensen, E. R., Tester, D. J., Kim, C. Y., Roche, P. C., Burgart L.J., Thiboeau, S. N., 1998, Hypermethylation of the hMLH1 Promotor in Colon Cancer with Microsatellite Instability, *Cancer Research*, 58, 3455-3460.
- Cunningham JM, Kim C-Y, Christensen ER, 2001, ‘‘The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas’’, *Am J Hum Genet* 69, 780-790.
- Çakar, E. Ş., 2007, ‘‘Genom Metilasyon Profiline Kolorektal Kanser Etiyolojisindeki Rolü’’, *Uzmanlık Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp fakültesi, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, Sivas.*
- Delattre, O., Olschwang, S., Law, DJ., Melot, T., Remvikos, Y., Salmon, RJ. et. al., 1989, ‘‘Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer’’, *Lancet*, 2, 353-356.
- Debeleş-Bütüner, B., Kantarcı, G., 2006, ‘Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi’, *Ankara Ecz. Fak. Derg. J. Fac. Pharm.*, 35(2)149, 149-170
- Deligezer, U., Akisik E. E., Nilgün E., Dalay N., 2008, ‘‘Sequence-Specific Histone Methylation is Detectable on Circulating Nucleosomes in Plasma’’, *Clinical Chemistry*, 54, 1125-1131
- Delgado, S., Gomez, M., Bird, A., Antequera, F., 1998, "Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes", *EMBO J.*, 17, 2426-2435.
- Doğu, G. G., Çıtıl, R., Dikilitaş, M., Özkan, M., Er, Ö., Öztürk, A., Altınbaş, M., 2007, ‘‘Kemoterapi alan hastaların sosyodemografik ve tanısal özellikleri’’, *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)*, 29(2), 132-138.
- Durhan, E., 2006, ‘‘Kolon Kanseri Tanılı Olgularda PCR-RFLP Metodu ile p53 Gen Mutasyonlarının Saptanması’’, *Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.*
- Eaton, L., 2003, ‘‘World cancer rates set to double by 2020’’, *BMJ*. 2003 Apr 5, 326 (7392), 728.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P.A., 2004, ‘‘Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy’’, *Nature*, 429, 457–463.
- Esteller, M., 2002, ‘‘CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future’’, *Oncogene*, 21, 5427–40.

- Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S.B., Herman, J.G., 2001, ‘‘A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer’’, *Cancer Research*, April 1561, 3225–3229.
- Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M., Kolodner, R., 1993, ‘‘The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer’’, *Cell*, 75(5), 1027-38.
- Franks, L.M., Teich, N., 1996, ‘‘Introductin to the Cellular and Molecular Biology of Cancer’’, 28-29.
- Gaudet F., Hodgson J.G., Eden A., Jackson-Grusby L., Dausman J., Gray J.W.,Leonhardt H., Jaenisch R., 2003, ‘‘Induction of Tumors in Mice by Genomic Hypomethylation’’, *Science*, 300, 489–92.
- Genuardi, M.; Viel, A.; Bonora, D.; Capozzi, E.; Bellacosa, A.; Leonardi, F.; Valle, R.; Ventura, A.; Pedroni, M.; Boiocchi, M.; Neri, G.1998 ‘‘Characterization of MLH1 and MSH2 alternative splicing and its relevance to molecular testing of colorectal cancer susceptibility’’, *Hum. Genet.*, 102, 15-20.
- Gille, JJP., Hogervorst, FBL., Pals, G., Wijnen, JTh., Schooten, RJ van., Dommering, CJ., Meijer, GA., Craanen, ME., Nederlof, Jong D de., McElgunn, CJ., Schouten, JP., Menko, FH., 2002, ‘‘Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach’’, *British Journal of Cancer*, 87, 892 – 897
- Giovannucci, E., Rimm, EB., Stampfer, MJ., 1994, ‘‘Intake of fat,meat,and fiber in relation to risk of colon cancer in men’’, *Cancer Res*, 54(9), 2390-7.
- Goessl, C., Krause, H., Muller, M., Heicappell, R., Schrader, M., Sachsinger, J., Miller, K., 2000 ‘‘Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids’’, *Cancer Research*, 60, 5941–5945
- Grady, W. M., Rajput, A., James D. Lutterbaugh, J. D., Sanford D. Markowitz, S. D., 2001, ‘‘Detection of Aberrantly Methylated *hMLH1* Promoter DNA in the Serum of Patients with Microsatellite Unstable Colon Cancer’’, *Cancer Research*, 61, February 1, 900–902.
- Gryfe, R., Swallow, C., Bapat, B., Redston, M., Gallinger, S., Couture, J., 1997, ‘‘Molecular biology of colorectal cancer’’, *Curr Probl Cancer.*, 21, 233–300.

- Gylling A., 2008, “Molecular mechanisms of cancer predisposition in HNPCC/Lynch syndrome”, Academic Dissertation, University of Helsinki, Department of Medical Genetics, Helsinki.
- Hamilton, SR., Vogelstein, B., Kudo, S., 2000 (Eds.), “World Health Organization Classification of Tumours”, Pathology & Genetics, Tumours of the Digestive System, IARC Press, Lyon, 103-47.
- Hayward, B. E., De Vos, M., Valleley, E. M. A., Charlton, R. S., Taylor, G. R., Sheridan, E., Bonthron, D. T., 2007, “Extensive gene conversion at the PMS2 DNA mismatch repair locus”, Hum. Mutat., 28, 424-43.
- Herman, J. G., Umar, A., Polyak, K., Graff, J. R., Ahuja, N., Issa, J. P. J., Markowitz, S., Willson, J. K. V., Hamilton, S. R., Kinzler, K. W., Kane, M. F., Kolodner, R. D., Vogelstein, B., Kunkel, T. A., Baylin S. B., 1998, “Incidence and functional consequences of *hMLH1* promoter hypermethylation in colorectal carcinoma”, Genetics, 95, 6870–6875.
- Herman, J., Graff, J., Myohanen, S., Nelkin B., Baylin, S., 1996, “Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands”, Medical Sciences, 93, 9821-9826.
- Jen, J., Kim H., Piantadosi, S., 1994, “Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer.”, N Engl J Med, 331, 213-21.
- Jenuwein, T. & Allis., 2001, “Translating the histone code”, Science, 293, 1074–1080.
- Jeuken, WM J., Sandra, JB. C., Martine, V., Dekkers, MG M., Errami, A., Sibjen, A., Boots-Sprenger, HE S., Wesseling, P., 2007, “MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas”, Laboratory Investigation 87, 1055–1065.
- Jones, P.A., Baylin, S.B., 2002, “The fundamental role of epigenetic events in cancer”, Nat Rev Genet., 3, 415–28.
- Jones, PA., Takai, D., 2001, “The role of DNA methylation in mammalian epigenetics”, Science, 293(5532), 1068-70.
- Kalble, T., Tricker, AR., Friedl, P., 1990, “Ureterosigmoidostomy, Long-term results, risk of carcinoma, and etiological factors for carcinogenesis”, J Urol, Vol.144, pp.1110-4.
- Kane. M. F., Loda. M., Gaida, G. M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup,

- J. M., Kolodner. R., 1997, ‘‘Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH 1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines’’, *Cancer Res.*, 57, 808-811.
- Kass, S.U., Pruss, D., Wolffe, A.P., 1997, ‘‘How does DNA methylation repress transcription?’’, *Trends Genet.*, 13(11), 444-9.
- Kılıç, N., 2005, ‘‘Lehninger Biyokimyanın İlkeleri’’, Palme, Türkiye, p.950-957.
- Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, 2000, ‘‘Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite- unstable colorectal cancers’’, *Am J Pathol*, 156, 1773-1779.
- Lengauer, C., Kinzler K.W., Vogelstein B., 1997, ‘‘DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells’’, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94, 2545–50.
- Ligtenberg, M. J. L., Kuiper, R. P., Chan, T. L., Goossens, M., Hebeda, K. M., Voorendt, M., Lee, T. Y. H., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Hendriks-Cornelissen, S. J. B., Tsui, W. Y., Kong, C. K., Brunner, H. G., Kessel, A. G. V., Yuen, S. T., Krieken, J. H. J. M., Leung, S. Y., Hoogerbrugge, N., 2009, ‘‘Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3¢ exons of TACSTD1’’, *Nature Genetics*, 41, Number 1, 112 – 117.
- Lipkin, S.M., Wang, V., Jacoby, R., 2000, ‘‘MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability.’’. *Nat. Genet.*, 24(1), 27–35.
- Lipkin, S. M., Wang, V., Jacoby, R., Banerjee-Basu, S., Baxevanis, A. D., Lynch, H. T., Elliott, R. M., Collins, F. S., 2000, ‘‘MLH3; a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability’’, *Nature Genet.*, 24, 27-35.
- Michalowsky, L.A., Jones, P.A., 1989, ‘‘DNA methylation and differentiation’’, *Environ Health Perspect*, 80, 189–97.
- Morak, M., Schackert, H. K., Rahner, N., Betz, B., Ebert, M., Walldorf, C., Royer-Pokora, B., Schulmann, K., Knebel-Doeberitz, M., Dietmaier, W., Keller, G., Kerker, B., Leitner, G., Elke Holinski-Feder, E., 2008, ‘‘Further evidence for heritability of an epimutation in one of 12 cases with MLH1 promoter methylation in blood cells clinically displaying HNPCC’’, *European Journal of Human Genetics*, 16, 804–811.
- MRC, 2005, ‘‘Cheap and Sensitive genomic profiling’’, *MLPA*, Vs.02, 1-6

- MRC-Holland, 2007, ‘‘MS-MLPA DNA Methylation Quantification Protocol’’, Vs.08, Protocol page 1-16
- Murell, A., Rakyanc K. V., Beck, S., 2005, ‘‘From genome to epigenome’’, Human Mol. Gen., 14, review issue, R3-R10.
- Mulcahy, HE., Lyautey, J., Lederrey, C., Chen, X., Anker, P., Alstead, EM., 1998, ‘‘A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients’’, Clin Cancer Res, 4, 271-5
- Nakaji, S., Ishiguro,S., Iwane, S., Ohta,M., 2004, ‘‘The prevention of colon carcinogenesis in rats by dietary cellulose is greater than the promotive effect of dietary lard as assessed by repeated endoscopic observation’’, The Journal of Nutrition, 134, 1935-8.
- Nicolaides, N. C., Palombo, F., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Jiricny, J., 1996, ‘‘Molecular cloning of the N-terminus of GTBP’’, Genomics, 31, 395-397.
- Nyngren, A. O. H., Ameziane, N., Duarte, H.M.B., Vijzelaar, R. N. C. P., Waisfisz, Q., Hess, C. J., Schouten, J.P., Errami A., 2005, ‘‘Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences’’, Nucleic Acids Research, 33(14), 128.
- Öztürk, M., 1998, ‘‘Kanserde Ulusal Sorunlarımız’’, Kanser Kongresi Bilimsel Program Kurulu Ön Raporu, 6-7 Haziran 1998 İzmir, 24-25 Ekim 1998 İstanbul PA 196 USA, 423- 7
- Papadopoulos, N., Nicolaides, N. C., Liu, B., Parsons, R., Lengauer, C., Palombo, F., D'Arrigo, A., Markowitz, S., Willson, J. K. V., Kinzler, K. W., Jiricny, J., Vogelstein, B., 1995, ‘‘Mutations of GTBP in genetically unstable cells’’, Science, 268, 1915-1917.
- Patel, A., Groopman, JD., Umar, A., Ann, N. Y., 2003, ‘‘DNA methylation as a cancer specific biomarker, from molecules to populations.’’, Acad, 983, 286-297.
- Petersen, S., Thames, HD., Nieder, C., 2001, ‘‘The results of colorectal cancer treatment by p53 status’’, Dis Colon Rectum, 44, 322-33.
- Razin, A., Cedar, H., 1994, ‘‘DNA methylation nad genomic imprinting’’, Cell, 77(4), 473-6.
- Redston, M., 2004, ‘‘Surgical Pathology of the GI tract, Liver, Biliary tract, and Pancreas’’, Saunders, 441-472.

- Richardson, B. C., 2002, "Role of DNA Methylation in the Regulation of Cell function, Autoimmunity, Aging and Cancer", *Nutrition*, 132, 2401–05.
- Roche, Molecular Biology Education , Aralık 2005, Computer Software, Almanya
- Rydberg, B., Spurr, N., Karran, P., 1990, "cDNA cloning and chromosomal assignment of the human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase: cDNA expression in *Escherichia coli* and gene expression in human cells", *J. Biol. Chem.*, 265, 9563-9569.
- SALSA, 2008, "MS-MLPA KIT ME011 Mismatch Repair genes (MMR)", lot0408
- Scherer, S.J., Avdievich, E., Edelman, W., 2005, "Functional consequences of DNA mismatch repair missense mutations in murine models and their impact on cancer predisposition", *The Molecular Biology of Colorectal Cancer*, Biochemical Society, 689-693
- Schwartz, S.I., Shires, G.T., Spencer, F.C., Daly, J.M., Fisher, J.E., Galloway, A.C., 1999, "Colon, rectum and Anus in Principles of surger", Seventh edition, a division of The McGraw-Hill Companies, New York St. P, 2, 1336- 40.
- T.C. Başbakanlık Devlet İstatistikler Enstitüsü, 2002, "1999 Ölüm İstatistikleri İlçe ve İl Merkezlerinde", Türkiye, TC Başbakanlık Devlet İstatistikler Enstitüsü Yayınları.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S. B., Issa, J-P.J., 1999, "CpG island methylator phenotype in colorectal cancer", *Medical Sciences*, July 1999, 96, 8681-8686
- Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1992, "p53 function and dysfunction", *Cell*, 70, 523-526.
- Wang, L., Cunningham, J. M., Winters, J. L., Guenther, J, C., French, A. J., Boardman, L. A., Burgart, L. J., McDonnell, S. K., Schaid, D. J., and Thibodeau, S.N., 2003, "*BRAF* mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair", *Cancer Research*, September 1, 63, 5209–5212.
- Worthley, D.L., Whitehall, V.L., Spring, K.J., Barbara, A.L., 2007, "Colorectal carcinogenesis: Road maps to cancer", *World Journal of Gastroenterology*, 13(28), 3784-3791
- Wu, Y., Berends, M. J. W., Sijmons, R. H., Mensink, R. G. J., Verlind, E., Kooi, K. A., Sluis, V. D. T., Kempinga, C., Zee, van der A. G. J., Hollema, H., Buys, C. H. C. M., Kleibeuker, J. H., Hofstra, R. M. W., 2001, "A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer", *Nature Genet.*, 29, 137-138.

- Uludağ, A., 2007, “Küçük hücreli olmayan akciğer kanserleriyle ilişkilendirilmiş tümör süpressör genlerin Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) yöntemi ile metilasyon paternlerinin incelenmesi”, Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, Eskişehir
- Yamada, T., Nakamori, S., Ohzato, H., 1998, “Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma:correlation with clinicopathological features”, Clin Cancer Res, 4, 1527-1532.
- Yin, J., Kong, D., Wang, S. Zou, T. T., Souza, R. F., Smolinski, K. N., Lynch, P. M., Hamilton, S. R., Sugimura, H., Powell, S. M., Young, J., Abraham, J. M., Meltzer, S. J., 1997, “Mutation of hMSH3 and hMSH6 mismatch repair genes in genetically unstable human colorectal and gastric carcinomas”, Hum. Mutat. 10, 474-478.

6.1. İnternet Kaynakları

	Erişim Tarihi
1. www.ctf.edu.tr/anabilimdallari/pdf/579/Kanser.pdf	27.11.2008
2. http://www.genetikbilimi.com/genbilim/kansernedir.htm	18.05.2007
3. http://www.genetikbilimi.com/genbilim/kanserhucre.gif	18.05.2007
4. www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/colon/patient	30.03.2007
5. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/	04.07.2007
6. http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/sunu/s_metil.pdf	18.05.2008

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :İbrahim ÇEKEN

Doğum Yeri :Konya

Doğum Tarihi :19.07.1981

Medeni Hali :Evli

Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Selçuklu Süper Lisesi

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yükses Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana
Bilim Dalı