

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**KOLOREKTAL KANSER METASTAZINDA “BRMS1 GEN
EKSPRESYONU” VE “SPOP GEN MUTASYONU”NUN
PROGNOSTİK ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Şerife SAR**

**Danışman
Doç. Dr. Çetin SAATÇİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Aralık 2014
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**KOLOREKTAL KANSER METASTAZINDA “BRMS1
GEN EKSPRESYONU” VE “SPOP GEN
MUTASYONU”NUN PROGNOSTİK ÖNEMİNİN
ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan
Şerife SAR**

**Danışman
Doç.Dr.Çetin SAATÇI**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2013-4203 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Aralık 2014
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı Soyadı: Şerife SAR

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Kolorektal Kanser Metastazında ‘BRMS1 Gen Ekspresyonu’ ve ‘SPOP Gen Mutasyonu’nun Prognostik Öneminin Araştırılması” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Şerife SAR

İmza 

Danışman

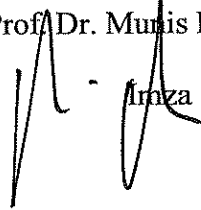
Doç.Dr.Çetin SAATÇI

İmza



Tıbbi Genetik ABD Başkanı

Prof.Dr. Munis DÜNDAR

İmza 

Doç.Dr.Çetin SAATÇİ danışmanlığında Şerife SAR tarafından hazırlanan “**Kolorektal Kanser Metastazında ‘BRMS1 Gen Ekspresyon’ ve ‘SPOP Gen Mutasyonu’nun Prognostik Öneminin Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

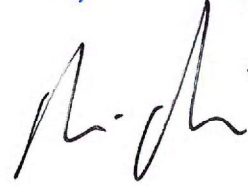
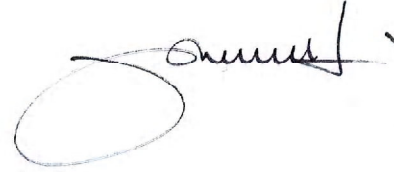
29/12/2014

JÜRİ:

Danışman : Doç.Dr.Çetin SAATÇİ
(Tıbbi Genetik AD.)

Üye : Prof.Dr.Munis DÜNDAR
(Tıbbi Genetik AD.)

Üye : Prof.Dr.Kemal DENİZ
(Pataloji AD.)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun **22.01.2015** tarih ve **66.1** sayılı kararı ile onaylanmıştır.

22/01/2015

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgisi ve tecrübesi ile bana yol gösteren, danışmanlığın çok ötesinde içten ve samimi yaklaşımıyla manevi desteğini üzerimden eksik etmeyen çok değerli hocam ve danışmanım Doç.Dr.Çetin SAATÇİ' ye,

Yüksek Lisans Eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri, anlayış ve hoşgörülerini için değerli hocalarım Prof.Dr.Munis DÜNDAR' a ve Prof.Dr.Yusuf ÖZKUL' a

Patoloji Anabilim Dalı'nda vakalarımın tamamını temin etmemde yardımcı olan Prof.Dr.Kemal DENİZ' e

Laboratuvar bilgisi ve tecrübesiyle her daim yardıma koşan, sorunlarımı sabırla dinleyip bana yol gösteren ve tezimin düzeltmelerinde büyük emeği geçen değerli hocam, Yrd.Doç.Dr.Yagut AKBAROVA ERDEM' e

Sabriyla, içtenliğiyle ve en güzeli de insanlığıyla her daim desteğini esirgemeyen, beni hiç bir anımda yalnız bırakmayan, bazen bana kızarak da olsa düşen motivasyonumu en tepeye çıkaran, Uzm. Moleküler Biyolog Hilal AKALIN'a

Çalışmam sürecinde tezin her aşamasında ve özellikle dizi analizi çalışmasında yardımlarını ve manevi desteğini esirgemeyen bölüm arkadaşım Yasin ADA' ya

Yoğun iş tempolarına rağmen vakalarımın rapor bilgilerine ulaşmamda yardımcı olan ve bana her ihtiyaç duyduğumda sabırla yaklaşan değerli bölüm sekreterlerimiz Özlem DOĞAN ve Özgül ÖZBEK'e

Manevi desteklerini benden esirgemeyen ve birlikte olmaktan mutluluk duyduğum çalışma arkadaşlarım Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ailesine,

Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine,

En zor zamanlarımda sırtımı yasladığım, her ihtiyaç duyduğumda uzakta olsalar dahi yanımda hissettiğim, tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen canım kardeşlerim Nurullah Sami SAR, Enes Safa SAR ve Hamdi Taha SAR'a

Doğduğum andan beri ilgisini, sevgisini ve emeğini hep üzerimde hissettiğim biricik halam Fatma KURUMAHMUT'a

Her zaman ve her konuda beni destekleyen ve hep yanımda olan ömrüm boyunca minnet duyacağım başta Babam Hamdi SAR ve Annem Dürdane SAR olmak üzere çok değerli geniş aileme TEŞEKKÜRÜ BİR BORÇ BİLİRİM.

Şerife SAR, KAYSERİ 2014

**KOLOREKTAL KANSER METASTAZINDA “BRMS1 GEN EKSPRESYONU”
VE “SPOP GEN MUTASYONU”NUN PROGNOSTİK ÖNEMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Şerife SAR

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2014

Danışman: Doç.Dr.Çetin SAATÇI

ÖZET

BRMS1 geni birincil tümör oluşumunu etkilemez fakat metastazı baskılar. BRMS1 in yeni bağlayıcı partneri olan Cul3, E3 ubiquitin ligazın bir bileşenidir ve BRMS1 ile Cul3 arasındaki etkileşime SPOP adaptör proteini aracılık eder. BRMS1, Cul3-SPOP kompleksi tarafından ubiquitinlenmiş olan güçlü bir alt tabaka olarak karşımıza çıkmaktadır. SPOP ekspresyonu azaldığında veya mutasyonlarında BRMS1 protein seviyesi artar ve BRMS1’in baskıladığı hedef genlerin ekspresyonu baskılanır. Yeni bir yayın dışında, şimdiye kadar BRMS1 geninin ekspresyonunun ve SPOP geninin mutasyonunun kolorektal kanser metastazında rolü araştırılmamıştır. Bu çalışmamızda BRMS1’in mRNA ekspresyonunun ve SPOP mutasyonlarının kolorektal kanser metastazındaki rolü ile ilişkisi değerlendirildi. BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyi ve SPOP gen mutasyonları 60 hastanın parafine gömülü kolorektal dokusunda incelendi.

Sonuç olarak, SPOP geninin incelediğimiz bölgesinde mutasyon tespit edilmemiştir. BRMS1’in yüksek düzeyde ekspresyonunun kolorektal kanserde metastazı baskıladığını göstermekle birlikte, bu sonucun daha geniş hasta serisinde çalışılarak desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler:Kolorektal Kanser, BRMS1, SPOP, Ekspresyon, Mutasyon

**THE RESEARCH OF PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF “BRMS1 GENE
EXPRESSION AND SPOP GENE MUTATION IN METASTASIS OF
COLORECTAL CANCER**

Şerife SAR

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Medical Genetic

Master’s Thesis, Desember 2014

Supervisor: Doç.Dr.Çetin SAATÇI

ABSTRACT

Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) suppresses metastasis without affecting primary tumorigenesis. Cul3, a component of E3 ubiquitin ligase, is a new binding partner of BRMS1 and the interaction between BRMS1 and Cul3 is mediated by the SPOP adaptor protein. BRMS1 turns out to be a potent substrate that is ubiquitinated by the Cul3–SPOP complex. Knockdown or mutations of SPOP increases the level of BRMS1 protein and represses the expression of BRMS1 repressive target genes in breast cancer cells. However, BRMS1 mRNA expression and SPOP mutations role in colorectal cancer has never been investigated. In this present study, we evaluated the association of BRMS1 expression and SPOP mutations role in metastasis of colorectal cancer. BRMS1 expression and SPOP mutations examined in formalin fixed paraffin-embedded colorectal cancer tissues of 60 patients. In conclusion there was no metation detected where the location analysed of the SPOP. In conclusion not only show that highly expression of BRMS1 repress the metastasis on colorectal cancer but also should be fortify by examining at a large sequence of patients.

Key Words: Colorectal Cancer, BRMS1, SPOP, Expression, Mutation

İÇİNDEKİLER

KOLOREKTAL KANSER METASTAZINDA “BRMS1 GEN EKSPR“SPOP GEN MUTASYONU”NUN PROGNOSTİK ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI

İÇ KAPAK	ii
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.KOLOREKTAL ANATOMİ	3
2.1.1.Kolon Anatomisi	3
2.1.2.Rektum Anotomisi.....	6
2.2.EMBRIYOLOJİ	8
2.3.HİSTOLOJİ	8
2.4.FİZYOLOJİ	9
2.5.KANSER	10
2.5.1.Karsinogenez	11
2.5.2.Kolorektal Kanser	13
2.5.3.Epidemiyoloji.....	13
2.5.4.Etyoloji	15
2.5.4.1.Genetik Faktörler	16
2.5.4.2.Adenomlar	17
2.5.4.3.Diyete Bağlı Faktörler	18
2.5.4.4.Obezite.....	19
2.5.4.5.Sigara Kullanımı	19

2.5.4.6.Radyasyon.....	19
2.5.4.7.Diğer Faktörler	19
2.5.5.Kolorektal Karsinogenez	19
2.5.5.1.Kolorektal Karsinogenezde Moleküler Ara Yollar	20
2.5.5.1.1.Kromozomal İnstabilite (“Chromozomal Instability: CIN”) Ara Yolu	21
2.5.5.1.2.Mikrosatellit İnstabilite (MSI) Ara Yolu	25
2.5.5.1.3.“CPG” Ada Metilator Fenotipi (“CIMP”) Ara Yolu	27
2.5.5.2.Kolorektal Karsinomların Lokalizasyonu	28
2.5.6.Klinik Bulgular	28
2.5.7.Makroskopik Bulgular	30
2.5.8.Mikroskopik Özellikler	30
2.5.9.Histolojik Grade	33
2.5.10.Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Özellikler	34
2.5.11.Tümör Yayılması ve Metastaz.....	35
2.5.12.Kolorektal Karsinomda Evre.....	36
2.6.BRMS1 GENİ VE FONKSİYONU	40
2.7.SPOP GENİ ve FONKSİYONU	42
2.8.BRMS1 VE SPOP İLİŞKİSİ	43
3.GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1.ARAŞTIRMANIN TİPİ	46
3.2.ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI	46
3.3.ARAŞTIRMADA KULLANILAN MATERYAL	46
3.3.1.Hasta grubu	46
3.3.2.Kontrol Grubu	47
3.4.VERİ TOPLAMA ARAÇLARI	47
3.5.YÖNTEM	47
3.5.1.Dokudan RNA İzolasyonu:	48
3.5.2.cDNA Eldesi :	51
3.5.3.Ekspresyon Analizi	52
3.5.4.Dokudan DNA İzolasyonu:	54

3.5.5.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	57
3.5.6.Örneklerin AgaroZ Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	61
3.5.7.Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Yöntemi ile Mutasyon Tarama:	62
3.5.8.DNA Dizi Analizi	65
3.5.9.İstatistiksel Analiz	68
4.BULGULAR	69
4.1.KLİNİKOPATOLOJİK BULGULAR	69
4.2.DEMOGRAFİK BULGULAR	70
4.2.1.Yaş	70
4.2.2.Cinsiyet	71
4.3.MOLEKÜLER BULGULAR	72
4.3.1.DNA-RNA İzolasyonu ve Spektrofotometrik Analizi	72
4.3.2.BRMS1 mRNA Ekspresyon Analiz Sonuçları	75
4.3.3.SPOP Mutasyon Analizi Sonuçları	79
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	86
6.KAYNAKÇA	95
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

APC	Adenomatous Polyposis Coli
BRAF	B-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog
BRMS1	Breast Cancer Metastasis Suppressor 1
CEA	Karsino Embriyonik Antijen
DNA	Deoksiribonükleik asit
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
FAP	Fibroblast Activation Protein
FOXA1	Forkhead Box A1
HDAC	Histon Deasetilaz Kompleksi
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2
HNPCC	Hereditör Non Polipozis Kolorektal Kanser
İMA	Inferior Mezenterik Arter
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
MED12	Mediator Complex Subunit 12
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MSI-H	Yüksek Mikrosatellit Instabilite
MSI-L	Düşük Mikrosatellit Instabilite
NFkB	Nükleer Faktör k-B Activity
pH	Power Hidrojen
PLAP	Plasental Alkalın Fosfataz
SMA	Superior Mezenterik Arter
SPOP	Speckle-Type POZ Protein
UICC	Uluslar Arası Kanser Birliği
UV	Ultra Violet
WHO	World Health Organization

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa no:</u>
Şekil 2.1. Kolon Segmentleri.....	4
Şekil 2.2. Kolon Arterleri.....	4
Şekil 2.3. Kolonun Lenfatik Drenajı.....	5
Şekil 2.4. Rektum ve Anal Kanal	6
Şekil 2.5. Rektosigmoid Bölgenin İnervasyonu	8
Şekil 2.6. Normal Hücreden Kanser Hücresine Dönüşüm Aşamaları	11
Şekil 2.7. Kadınlarda Yerleşim Yerlerine Göre En Sık Görülen Kanseler.....	14
Şekil 2.8. Erkeklerde Yerleşim Yerlerine Göre En Sık Görülen Kanseler	14
Şekil 2.9. Kolorektal Karsinogeneze Etiyolojik Yaklaşım	15
Şekil 2.10. Fearon ve Volgestein'in Tanımladığı Kolorektal Karsinogeneze Modeli.....	20
Şekil 2.11. Kolorektal Karsinogeneze Multistep Moleküler Gelişim Modeli.....	21
Şekil 2.12. WNT Ara Yolunda APC β /Katenin İlişkisi	22
Şekil 2.13. p53 Ara Yolu.....	23
Şekil 2.14. RAS-Mapk Sinyal Ara Yolu	24
Şekil 2.15. TGF- β /SMAD Ara Yolu.....	25
Şekil 2.16. BRMS1 Geninin Sitogenetik Lokasyonu	41
Şekil 2.17. SPOP Geninin Sitogenetik Lokasyonu	43
Şekil 3.1. RNA İzolasyon Şeması.....	50
Şekil 3.2. DNA İzolasyon Şeması	56
Şekil 3.3. Primer Denemesi Agaroz Jel Görüntüsü	59
Şekil 3.4. Örnek PCR Görüntüsü.....	62
Şekil 3.5. Restrüksiyon Kesimi ve Jel Görüntüsü	63
Şekil 3.6. DNA Dizi Analizi Prosesi.....	66
Şekil 3.7. Dizi Analizi Sonucunda Elde Edilen Elektroferogram.....	66
Şekil 4.1. Tüm Olguların Yaşa Göre Dağılımı	70
Şekil 4.2. Metastatik Grup Cinsiyet Dağılımı.....	71
Şekil 4.3. Non-Metastatik Grup Cinsiyet Dağılımı	71
Şekil 4.4. Kontrol Grubu Cinsiyet Dağılımı.....	72
Şekil 4.5. İzole edilen DNA Örneklerinin PCR Ürünlerinin Temsili Agaroz Jel Görüntüsü	73

Sayfa no:

Şekil 4.6. Bazı Hastların Ekspresyon Görüntüsü	76
Şekil 4.7. SPOP Geni Üzerindeki Sık Mutasyona Uğrayan Bölgeler	79
Şekil 4.8. PCR Ürünü	81
Şekil 4.9. Bazı Örneklerin TfiI Restriksiyon Enzim Kesimi Görüntüsü.....	82
Şekil 4.10. Bazı Örneklerin DrdI Enzim Kesim Görüntüsü.	83
Şekil 4.11. Çoklu Hizalama	84
Şekil 4.12. SPOP 6.ekzon Sekans Analizi Görüntüsü.....	85
Şekil 4.13. SPOP 7.Ekzon Dizi Analizi Görüntüsü	85
Şekil 5.1. Deneyde Kullanılan Mutantların Şematik Diyagramı	92
Şekil 5.2. BRMS1' in Cul3-SPOP E3 Ubiquitin Ligaz Kompleksiyle Ubikitinleşmesi.....	93
Şekil 5.3 Birden Fazla Alanda Yapılan Çalışmada Mutasyona Uğrayan Genler ve Mutasyon Çeşitleri	94
Şekil 5.4. SPOP MATH Domaininin Modeli	95

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa no:</u>
Tablo 2.1. 1932 Dukas Evrelemesi.....	37
Tablo 2.2. 1936 Dukas Evrelemesi.....	37
Tablo 2.3. Astler- Coller Evrelemesi	37
Tablo 2.4. TNM Sınıflandırması	37
Tablo 2.5. Farklı Evreleme Sistemlerine Göre Kolorektal Karsinomlarda Evreleme Kriterleri	39
Tablo 2.6. TNM Evre Gruplaması	40
Tablo 3.1 Çalışmada İzlenilen Yol.....	48
Tablo 3.2. cDNA Reaksiyonu İçin 1.Karışım.....	51
Tablo 3.3. cDNA Reaksiyonu İçin 2.Karışım.....	52
Tablo 3.4. cDNA Sentezi İçin Gerekli Sıcaklık Döngüsü	52
Tablo 3.5 Ekspresyon Analizi İçin Reaksiyon Karışımı	53
Tablo 3.6. Lightcycler 480II Software Programına Ayarlanan Sıcaklık ve Süre	53
Tablo 3.7. PCR İçin Örnek Reaksiyon	58
Tablo 3.8. PCR Reaksiyon Kompozisyonu.....	60
Tablo 3.9. PCR Cihaz Programı.....	60
Tablo 3.10. RFLP İçin Standart Mix Karışımı	64
Tablo 3.11. PCR Yıkama	67
Tablo 3.12. Sekans Reaksiyon Mixi	67
Tablo 3.13. Sekans Programı	68
Tablo 4.1. Bazı Hastaların İzole Edilen DNA'lara Ait Spektrofotometre Sonuçları	74
Tablo 4.2. Bazı Hastaların İzole Edilen DNA'lara Ait Spektrofotometre Sonuçları	75
Tablo 4.3. BRMS1 mRNA Ekspresyon Analizi Sonuçları.....	78
Tablo 4.4. Hasta Grubu ve Kontrol Grubu BRMS1 mRNA Ekspresyon Analizi	78
Tablo 4.5. SPOP Geni Üzerinde Sık Mutasyona Uğrayan Bölgeler	80
Tablo 4.6. Çeşitli Topluluklarda Görülen SPOP Mutasyonları	81

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüz teknolojiyle birlikte kanser biyolojisinin daha iyi anlaşılması, kanserden korunmada ve tedavisinde kayda değer gelişmeler sağlamış olsa da gelişmiş ülkelerde kanser nedenli ölümler halen yüksek düzeylerde bulunmakta ve toplumdaki tüm ölümlerin % 25' ini oluşturmaktadır (1,2). Kanserden ölümlerin % 90'ından ise metastaz gelişimi sorumludur (2,3). Metastaz, kanser hücrelerinin köken aldıkları bölgeden vücudun farklı doku ve organlarına yayılmasıdır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarla metastaz gelişiminde rol alan birçok basamak ve moleküler ajan bulunmuş olsa da, halen tümör metastazının mekanizmaları tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Ancak, son yıllarda kanser tedavisi için yapılan yoğun araştırmalarla birlikte metastazın mekanizmalarının kısmen de olsa aydınlatılmasıyla bu mekanizmaları hedef alan tedaviler geliştirilmeye başlanmış ve anti-metastatik tedaviler gündeme gelmiştir. Meme kanseri metastaz baskılayıcı 1 (BRMS1) primer tümörögenezi etkilemeden metastazı baskılamaktadır. BRMS1 in düzenleyici mekanizması yakın zamana kadar açıklanmamıştır. Yapılan çalışmalarda E3 ubiquitin ligazın bir komponenti olan cul3 'ün BRMS1' in bağlayıcı partneri olduğu ve cul3 ile BRMS1 arasındaki ilişkiye SPOP adaptör proteinin aracılık ettiği belirlenmiştir (4). 2kbp uzunluğunda mRNA yı kodlayan yeni klon SPOP (speckle-type POZ protein) incelendiğinde bütün insan dokularında exprese olduğu bulunmuştur (5). SPOP yokluğu BRMS1 protein düzeyini artırır ve meme kanser hücrelerinde OPN ve uPA gibi BRMS1 in baskılayıcı hedef genlerinin ekspresyonunu baskılar. Bu sonuçlar gösterir ki; cul3-SPOP tarafından BRMS1 in yeni düzenleyici mekanizması meme kanseri ilerlemesinde önemlidir (4). BRMS1 in ortotopik tümör büyümesine engel olmadan metastatik lezyonların dramatik

gerilemesine neden olduğu belirlenmiştir (5). BRMS1 rolü meme kanseri, yumurtalık kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri gibi birçok melanom dışı tümörler için iyi belgelenmiştir (1). Yalnız BRMS1 ve SPOP arasındaki ilişkinin kolorektal kanser ile bağlantılı olup olmadığı konusunda bir çalışma gerçekleştirilmemiştir.

Kolorektal karsinom, gelişmiş ülkelerde üçüncü sıklıktaki malign tümördür. Bütün kanserlerin yaklaşık %9 unu oluşturur (7-9). Kolorektal karsinomlar için her yıl tahmin edilen yeni vaka sayısı 150.000'dir. Hayat boyunca kolorektal karsinom gelişme riski yaklaşık % 6 dır ve bu oran erkeklerde kadınlardan daha yüksektir (9). Ortalama görülme yaşı 62'dir (11). Gelişme riski 40 yaşından sonra erkek ve kadınlarda artmaktadır (9). Amerika Birleşik Devletlerinde gastrointestinal sistemin en sık ve en iyi tedavi edilebilir karsinomudur. Sebebi ve oluşum mekanizması çevresel ve genetik faktörlerle ilişkilidir. Çevresel faktörler özellikle diyetle bağlıdır. Genetik olarak yüksek yatkınlık oluşturan iki durum; ailesel nonpolipozis kolon kanseri sendromları ve ailesel polipozisli hastalardır (7,11). Kolon kanseri erkekler arasında en yaygın üçüncü kanser, kadınlar arasında en yaygın ikinci kanserdir (12). İngiltere' de 100.000 de 32 sıklıkla gözlenir. Afrika ve Asya bölgelerinde daha az bir insidanstadır. Kalın bağırsak kanserlerinin neredeyse tamamı adenokarsinomlardır (%98). Kolon adenomlarının malignansi geliştirme potansiyeline sahip olduğu düşünülür ve hastaların %75 inde her ikisi birliktedir (13). Genel popülasyondaki solid kolonik poliplerin insidansı yaşla ilişkilidir. 60'lı yaşlarda %34' e varır ve 75 yaşın üzerinde %75' tir (14). Kolorektal kanserin süresini, seyrini ve sonucunun tahminini (prognozunu) birçok faktör etkilemektedir. Bu faktörlerden bazıları; tümör evresi, tümör lokalizasyonu, boyut, makroskopik yapı, lenfatik yayılım, hasta yaşı, cinsiyeti olarak sıralanabilir (8,11). Bu projede kolorektal kanser metastazında "BRMS1 gen ekspresyonu" ve "SPOP gen mutasyonu"nun prognostik öneminin araştırılması konu edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KOLOREKTAL ANATOMİ

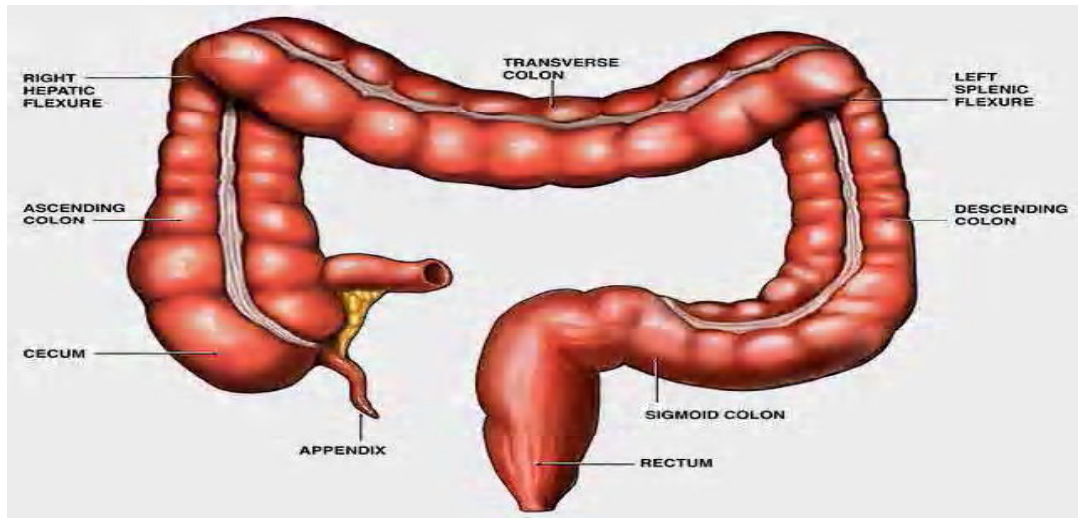
2.1.1. KOLON ANATOMİSİ

Ortalama 150 cm uzunluğunda olan kalın barsak, sindirim kanalının 1/5'ini oluşturur. İleumun bitiminden itibaren anüse kadar uzanır. Periton içinde ve retroperitoneal alanda karaciğer, dalak, mide, duodenum, ince barsak, böbrekler, üreterler ve mesane gibi organlarla komşuluk gösterir (15). Kalın bağırsağın ilk parçası olan çekumun uzunluğu ortalama 6 cm, genişliği 7.5–8.5 cm olup kolonun en geniş kısmıdır. Geniş bir lümene sahip olması ve duvarının ince olması nedeni ile intestinal obstrüksiyonlarda kolonun en sık perfore olan kısmıdır (15).

Çekumdan karaciğer sağ alt lobunun alt yüzüne kadar uzanan çıkan kolon burada hepatik fleksurayı yapar. Ön ve yan yüzleri peritonla örtülü olup yaklaşık 15–20 cm uzunluğundadır (15).

Transvers kolon, hepatik fleksura ile splenik fleksura arasında uzanır ve ortalama 50 cm uzunluğundadır (15).

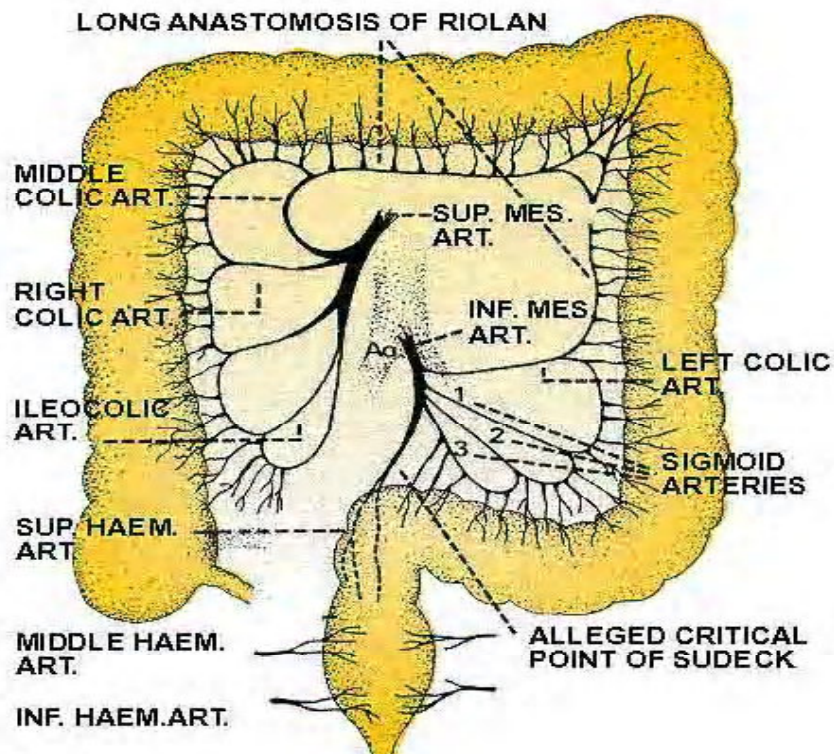
İnen kolon, splenik fleksuradan sol iliak fossaya kadar uzanır. Ortalama 25 cm uzunluğundadır. Kolonun en kalın kas tabakasına sahip bölümüdür. Yan ve ön yüzü peritonla örtülüdür. Sigmoid kolon, ortalama uzunluğu 40 cm olup çapı 2.5 cm ile kolonun en dar yeridir (Şekil 2.1) (15).



Şekil 2.1. Kolon Segmentleri (15).

Kolon Arterleri ve Venleri

Kalın bağırsaklar abdominal aorttan kaynaklanan ana iki damar olan superior ve inferior mezenterik arterlerden beslenirler(Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kolon Arterleri (16).

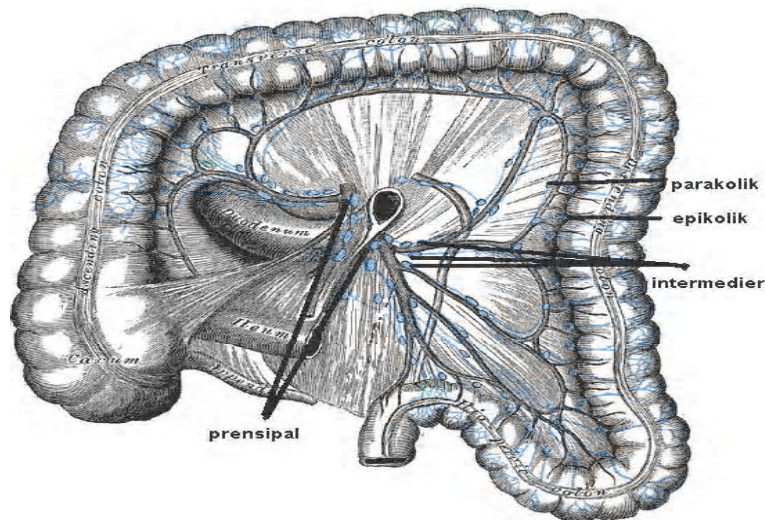
Süperior mezenterik arter (SMA), aortun ventralinden, çölyak kökün hemen altından çıkan arteridir. Pankreasın arkasından aşağıya doğru iner, duodenum 3. kısmını çaprazlayarak geçer, beslediği kısımlar; tüm incebarsaklar ile ileokolik ve orta kolik dalları yoluyla, çekum çıkan kolon ve transvers kolondur. İnferior mesenterik arter (İMA), infrarenal aortadan köken alır ve sol kolik, sigmoidal ve superior rektal dalları vasıtası ile inen kolon, sigmoid kolon ve üst rektumu besler (16-19).

Kolon venleri kolon arterlerini izlerler, bu sebeple aynı adı üstlenmişlerdir. Superior mezenterik venler, sağ kolonun venlerinden oluşur. Pankreas uzantısının arkasından splenik ven ile birleşir ve portal veni oluşturur. Sol kolonun venleri ise inferior mezenterik veni oluşturur. İnferior mezenterik arter yanından splenik ven ile birleşir ve portal ven oluşur (20).

Kolonun Lenfatik Drenajı

Kolonik lenf nodları dört gruba ayrılabilir (Şekil 2.3).

1. Epiploik lenf nodları; serozal yüzde epiploik apendices içerisinde
2. Parakolik lenf nodları; kolonik duvara komşu
3. İntermedier lenf nodları; kolik kan damarları boyunca
4. Preterminal lenf nodları; superior ve inferior mezenterik arterlerin ana trunkusları boyunca (16,17,19).



Şekil 2.3. Kolonun Lenfatik Drenajı (16).

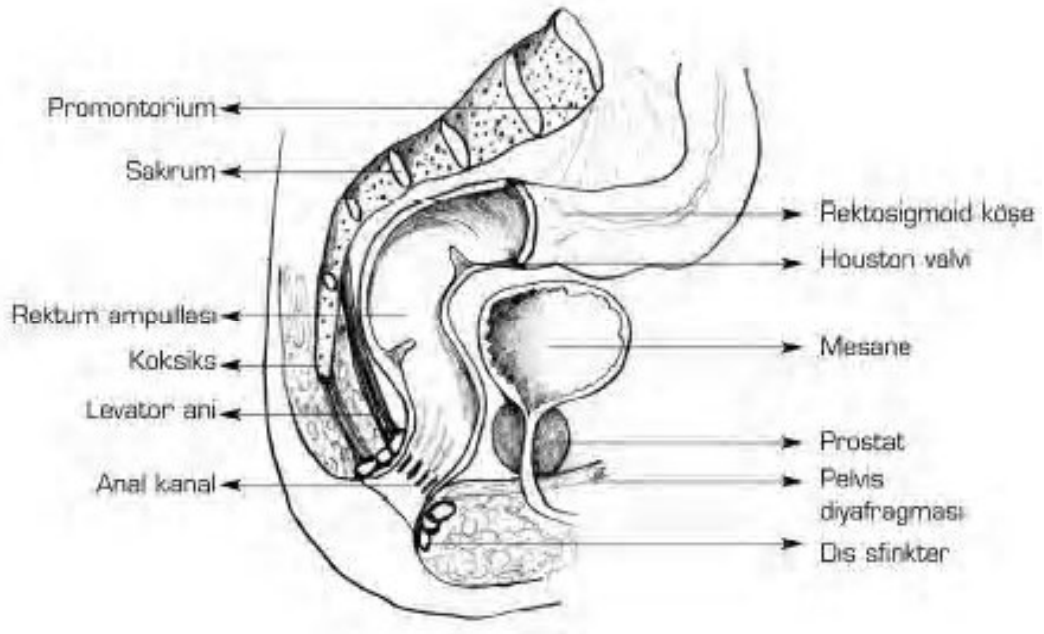
Kolon Sinirleri

Kalın bağırsağın sinir donanımı otonom sinir sistemi ile olur. Sempatik ve parasempatik liflerle gerçekleşir. Sempatik lifler T7-12 den çıkar ve submukozal (Meissner) ve myenterik (Auerbach) sinir uçlarında sonlanırlar.

Parasempatik innervasyon, sağ kolonda sağ vagus ile sol kolonda L1-3'den gelen lifler ile olur. Sempatik sistem hareketleri ve sekresyonu inhibe ederken, parasempatik sistem uyarıcı etki gösterir (20).

2.1.2. REKTUM ANOTOMİSİ

Rektum kolonun en son segmentidir ve asıl görevi depolamaktır. Makatla dışarı açılarak dışkıının dışarı çıkmasına olanak verir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Rektum ve Anal Kanal (16).

Klasik olarak 1/3 üst, 1/3 orta, 1/3 alt olmak üzere 3 bölüme ayrılır. Pratikte her bölüm 5 cm olarak hesaplanır. Rektum'un 3 kıvrımı vardır, proksimal ve distal olanlar sağa doğru konveks, orta bölüm ise sola doğru konvekstir, bu kıvrımlar lümeneye Houston valvleri (superior ve inferior fold) olarak uzanırlar. Bu mukozal iç kıvrımlar proktoskopik incelemelerde zorluğa neden olurlar fakat duvarın tüm katmanlarını içerdikleri için hem ayrımı kolay hem de perforasyon riski en az olan yerlerdir (16,17,19).

Rektum Arterleri ve Venleri

İMA in terminal dalı sol ana iliak arteri çaprazlarken süperior rektal arter adını alır, sigmoid mezokolon içinde aşağı iner ve 3. sakral kemik gövdesinde bifurkasyona uğrar, süperior rektal arterin sağ ve sol dalları, rektumun üst ve orta kısmını kanlandırır. Orta ve inferior rektal arterler ise, rektumun alt 1/3'ünü kanlandırır. Rektumun canlılığının sağlanması ve anastomoz güvenliği için orta rektal arterlerin korunması yararlı olabilir.

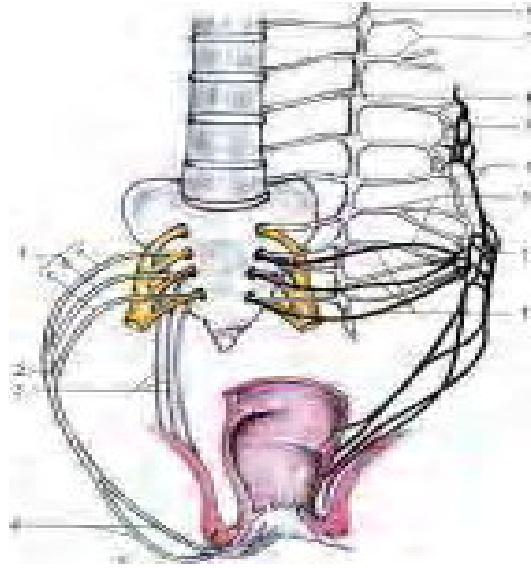
Orta sakral arter, aortik bifurkasyonun hemen üzerinden çıkar ve rektuma az miktarda kanlanma sağlarlar. Rektumun venöz drenajı arterleri izler ve hem portal sisteme hem de sistemik/kaval sisteme dökülürler. Üst ve orta rektum, superior rektal ven ile drene edilir, bu ven de inferior mezenterik ven ile portal sisteme dökülür. Alt rektum ve anal kanalın başlangıcı orta rektal venle drene edilirken bu da kaval sisteme internal iliak venler yoluyla dökülürler. Inferior rektal venler, alt anal kanalı drene ederek pudental venlere dökülerek bunlar da internal iliak venlerce kaval sisteme iletilir. Alt rektum tm'leri bu nedenle, sistemik ve portal venöz sisteme venöz dönüş sayesinde metastaz yaparlar (16,17,19).

Rektum ve Anal Kanalda Lenfatik Drenaj:

Rektum ve anal kanal zengin bir lenfatik ağa sahiptir (18). Rektumun üst 2/3'ünün lenfatikleri genellikle inferior mezenterik ve paraaortik nodlara dökülür. Alt 1/3'ünün lenfleri ise başlıca iki yoldan buradan ayrılır. İlki hemoroidal ve inferior mezenterik arterler boyunca; ikincisi ise orta hemoroidal damarları takip ederek lateraldeki internal iliak nodlara doğrudur (16,17).

Rektum ve Anal Kanal Sinirleri

Rektum ve anal kanal süperioru otonomik sinirlerle inerve olurken anal kanal inferioru ve anüs pudental sinirler yoluyla somatik olarak inerve olur. Otonom inerve olan rektuma karşı anodermal segment yoğun olarak bulunan somatosensör sinir uçlarına bağlı olarak dokunma, basınç, ağrı ve ısıya oldukça duyarlıdır. Rektumun inervasyonu, sempatik ve parasempatik sinirlerden oluşurlar. Torakal kolumnar segmentlerden alınan sempatik sinirler inferior mezenterik arterin altında birleşerek inferior mezenterik pleksusu oluştururlar. Inferior mezenterik pleksusun hasarına, inferior mezenterik arterin yüksek bağlanması sonrası rastlanır (Şekil 2.5) (16,17).



Şekil 2.5. Rektosigmoid Bölgenin İnervasyonu (16).

Periprostatik pleksus, pelvik pleksustan çıkar, bu pleksustaki karışık lifler rektum, internal anal sfinkter, mesane, prostat ve penisi inerve ederler (16,17,19).

2.2. EMBRİYOLOJİ

Kolonun proksimal kısmı (çekum, çıkan kolon, transvers kolon) embriyolojik orta bağırsaktan köken alırken kolonun kalan kısmı ve rektum ise embriyolojik arka bağırsaktan gelişir. Gelişiminin erken dönemlerinde orta bağırsağın uzaması dorsal mezenterin oluşmasına ve bu oluşumun karın arka duvarına asılmasına sebep olur. Gebeliğin yaklaşık 6. haftasında çekum bir divertikulum halinde tanınabilir. Kolon fetusun gelişimi süresince uzamaya devam eder ve son pozisyonunu alır. Distal arka barsak kloakaya girer ve anal kanal ile ürogenital yapının bazı kısımlarını oluşturur (21).

2.3. HİSTOLOJİ

Kalın barsak duvarı; mukoza, submukoza, muskularis propriya ve seroza (rektumda perimuskuler doku) olmak üzere dört tabakadan oluşur. Mukoza da epitel, lamina propriya ve muskularis mukoza olmak üzere üç tabakaya ayrılır.

1. Tunika mukoza: Mukozal yüzey tek sıralı alçak kolumnar veya kuboidal epitel ile döşelidir. Absorbtif hücreler ve goblet hücreleri içerir. Mukozal yüzeye açılan Liberkuhn kriptleri de matur absorbtif hücreler ve goblet hücreleriyle devamlılık

gösterir. Aynı zamanda immatur ve indiferansiye prekursor hücreler, endokrin hücreler ve Paneth hücreleri de kriptlerin bazalinde bol miktarda bulunur. Absorbtif hücreler su ve elektrolitleri absorbe ederler, goblet hücreleri ise musin sentez, depo ve salınımından sorumludur. Kolon mukozası ince barsak mukozasından daha fazla goblet hücresi içerir. İmmatur hücreler diğer bütün epitel hücrelerinin öncülüdür. Paneth hücrelerinin çok sayıda eozinofilik sekretuar granülü bulunur ve lizozim, epidermal büyüme faktörü gibi ürünler içerir. Bunlar normalde çekum ve proksimal sağ kolonda bulunurlar. Kolonun endokrin hücreleri proksimal ve distal kolonda özellikle rektumda bulunur. Lamina propriada kollojen lifler, düz kas demetleri, sinirler, kapillerler ve lenfatikler arasında seyrek dağılım gösteren lenfosit, plazma hücresi, histiosit ve mast hücreleri mevcuttur. Lamina propria germinal merkezleri olan, boyutlar yaş ile değişen ve rektumda daha büyük ayrıca sayıca daha fazla olma eğiliminde lenfoid nodüller içerebilir. Muskularis mukoza kapillerler ve lenfatiklerle sarılı kas ve sinir lifleri içerir.

2. Tunika submukoza: Lamina proprianın hücresel içeriğine sahip, noral pleksusu (Meissner pleksusu) bulunan, gevşek bağ dokusundan oluşmuş bir tabakadır.

3. Tunika muskularis: İçte sirkuler, dışta longitudinal kas tabakalarından oluşumludur ve bunların arasında miyenterik auerbach pleksusu mevcuttur.

4. Tunika seroza: Tek sıralı yassılaştırmış ya da kuboidal mezotelyal hücreler ile döşeli peritondan ve fibroelastik dokudan oluşur. Kan damarları ve lenfatikler içerir. Çekum, appendiks, transvers kolon ve sigmoid kolonu tam olarak sarar. İnen kolon, çıkan kolon ve rektumun distali ile anal kanal peritonun arkasında kalır (22-25).

2.4. FİZYOLOJİ

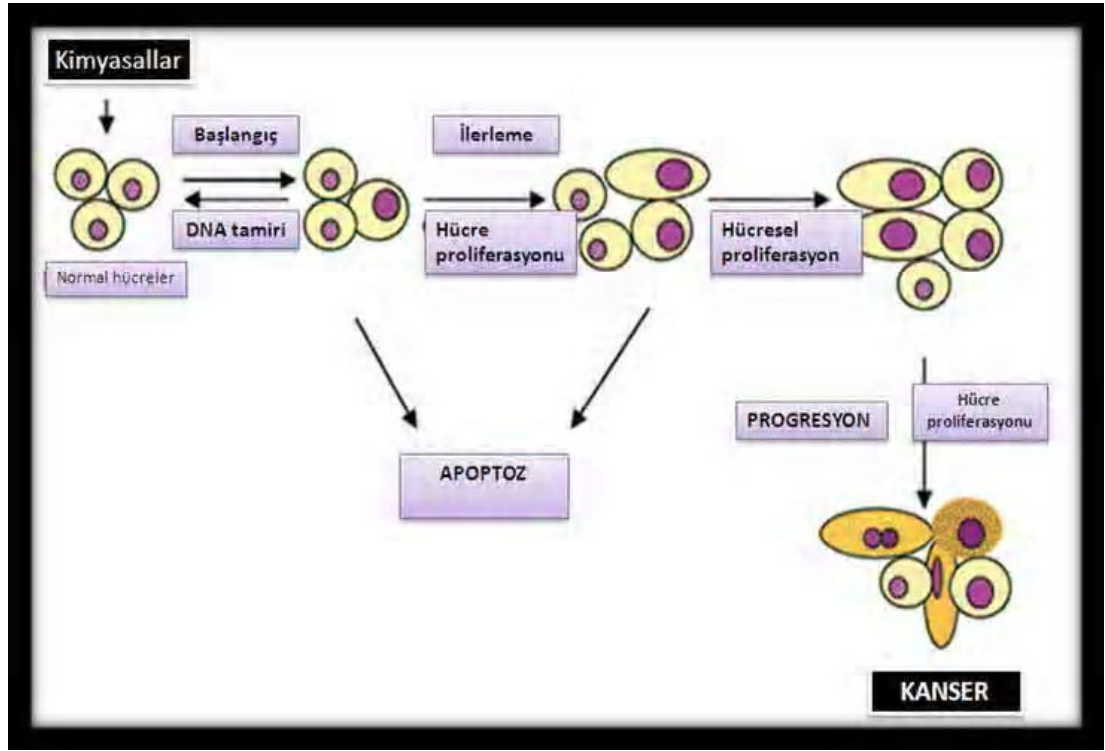
Kalın bağırsakların başlıca görevi depolama, emilim, taşıma ve salgılamadır. En önemli işlev olan emilim kolonun, proksimalde ileocekal kapak, distalde anal sfinkterler arasında kapalı tutularak gerçekleştirilir. Klorür emilimi karşılığında az miktarda bikarbonat lümene verilerek ortamın alkali olması sağlanır (pH 8-8.4). Potasyum salgılanan mukus ile lümene geçer. Böylelikle salgılama gerçekleşmiş olur. Emilim; her gün yaklaşık 600-1000 ml ileum içeriği kolona geçer. Bunun %90 'ı su iken dışkı ile atılan su miktarı 180 ml düzeyindedir. Su emiliminin hemen tamamı çekum ve çıkan kolonda meydana gelir. Ayrıca kolondan sodyum, klorür, laktoz ve sakkaroz da emilir. Kalın bağırsağın bir diğer önemli özelliği ise depolamadır. Kalın bağırsaklar dışkı ve bazı gazları depolarlar. Normal dışkının %70'i su iken %30'u ise katı maddeden oluşur.

Taşıma; kalın bağırsaklarda itici ve itici olmayan olmak üzere iki farklı hareket görülür. İtici olmayan hareketlerde haustralar sırayla kasılır kolon içeriği karışır ve sıvı elektrolit emilimi ve değişimi için mukoza teması sağlanmış olur. İtici tip hareketlerde ender olarak antiperistaltik hareketler de görülebileceği gibi bu hareketlerle içerik distale doğru taşınır. Bu taşınma birden fazla haustranın bir arada kasılması ve kütleli itme ve peristaltik hareketlerle olur. Ağızdan alınan gıda normalde 4.5 saatte çekuma gelir, çıkan kolonu 6 saat içinde doldurarak sağ fleksuraya erişir, 12 saatte sol fleksuraya varır ve yaklaşık 20 saatte rektosigmoide ulaşır (22).

2.5. KANSER

Kanser, hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve ölümünü regüle eden genlerde bozukluk sonucu oluşur. Dünyada en çok ölüme neden olan 1. hastalık grubunu kardiyovasküler hastalıklar oluştururken 2. hastalık grubunu ise kanser oluşturmaktadır (26).

Kanser, çevresel ve kalıtsal etken kaynaklıdır. Çok genli, çok faktörlü ve çok basamaklı gelişim gösteren bir hastalıktır (Şekil 2.6) (26,27). Genomun hasara uğraması sonucu normal hücreler kanser hücresine dönüşürler. Genomda meydana gelen bu hasar, DNA replikasyonunda meydana gelen hatalardan kaynaklı olabileceği gibi, metabolizma sırasında meydana gelen serbest radikallerin bazı DNA bazları üzerinden hasar oluşturması gibi nedenlerden de kaynaklanabilir. DNA hasarı, iyonize radyasyon, UV ve kimyasal karsinogen gibi ajanların etkileşimi ile de gerçekleşebilmektedir (28). Hücrede DNA hasar tamir mekanizmaları bulunmaktadır fakat eğer hasar farklı sebeplerden dolayı onarılamazsa genomda mutasyon adı verilen kalıcı değişiklikler meydana gelir.



Şekil 2.6. Normal Hücreden Kanser Hücreğine Dönüşüm Aşamaları (27).

Kanser hücrelerini tanımlayan bazı özellikler vardır. Bu hücreler büyüme sinyalleri oluşturabilir, büyümeyi durdurabilecek sinyallere karşı duyarsızlaşabildikleri gibi programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kaçabilir, sınırsız bölünebilirler. Aynı zamanda çoğalma potansiyeline sahip olabilmek, angiogenezi sürekli destekleyebilme, invazyon ve metastaz yapabilme özelliklerine de sahiptirler (26).

Son yıllarda, ileri teknoloji ile geliştirilen moleküler biyolojik tekniklerle, kanserin genetik temelini aydınlatılması, kalıtsal ve somatik mutasyonların tanımlanması amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda tüm kanserlerin yaklaşık %10-15'inin kalıtsal, %85-90'ının ise sporadik olarak ortaya çıktığı saptanmıştır (29).

2.5.1. Karsinogenez

Karsinogenezin kökeninde ölümcül olmayan genetik hasar yatar. “Genetik kanser hipotezi” olarak ifade edilen bu görüşte, bir tümörün, mutasyona uğrayan tek bir öncül hücrenin büyümesi ve çoğalması ile oluştuğu, dolayısıyla tümörün monoklonal olduğu ileri sürülmektedir. Söz konusu genetik hasar, hücrenin büyümesini stimüle eden proto-onkogenler, hücrenin büyümesini inhibe eden tümör baskılayıcı genler, programlı hücre ölümünü regüle eden genler ve DNA yanlış eşleşme tamir genlerinde gerçekleşmektedir (26,29). Bu gen grupları aşağıda sırasıyla tanımlanmaktadır;

Proto-onkogenler, normal hücrelerde proliferasyon ve diferensiyasyonu kontrol ederler. Hücre bölünmesi, normal hücrede fizyolojik gereksinimlere göre ve kontrollü olarak yürütülmektedir. Proto-onkogenler, yalnızca hücre bölünmesi sırasında görev alan bir dizi proteini kodlamaktadır. Bir proto-onkogen, mutasyona uğradığında aktivasyon kazanırsa hücrenin sürekli olarak bölünmesine neden olur. Tümör süpresör genler ise, hücre siklusunun çeşitli basamaklarında görev yapan ve hücre bölünmesini baskılayıcı özelliği olan proteinleri kodlar. Bu genlerin her iki alelinde de mutasyon olması, hücre bölünmesinin baskılanamaması ile kontrolsüz hücre bölünmesi şeklinde sonuçlanır. Apoptoz ya da programlı hücre ölümü, tamiri olanaksız DNA hasarı oluşmuş hücreleri ortadan kaldıran bir mekanizmadır. Programlı hücre ölümünün temel amacı, bir tür için gerekli kromozom sayısının uygun miktarda devam ettirilmesi ve anöploidinin önlenmesidir. Böylece, yalnızca DNA'sını doğru bir şekilde ve tam olarak replike etmiş hücrelerin mitozla girmesi sağlanır. Bu mekanizmayı kontrol eden ve apoptoz regülasyonundan sorumlu olan genlerde işlev kaybına neden olacak mutasyonlar, DNA hasarı taşıyan hücrelerin bölünmesine neden olur (30).

Genomik DNA üzerinde tekrarlayan baz dizilerinden oluşan mikrosatellitler vardır. Normal şartlarda, DNA polimerazın 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi ile yanlış eşleşmeler düzeltilirken, tekrarların olduğu bu bölgeler gözden kaçabilmektedir. Onarımdan kaçan bu alanlar, DNA yanlış eşleşme tamir sistemi tarafından tamir edilir. DNA yanlış eşleşme tamir genleri, replikasyon sırasında DNA polimerazın hatalı baz eklemesi sırasında devreye giren ve hatalı bazı düzelten genlerdir. Bu genlerde mutasyon olması durumunda, onarım yapılamayacağından, mikrosatellit instabilitesi olarak bilinen durum ortaya çıkmaktadır (29).

Ayrıca, kanser hücrelerinin, hücre yaşlanmasından (senesens) kaçtığı düşünülmektedir. Potansiyel bir anti-kanser mekanizma olan hücre yaşlanması, p53 ve pRB gibi tümör baskılayıcı genler tarafından kontrol edilir ve hücrenin proliferasyon yeteneğinin geri dönüşümsüz olarak kaybı ile karakterizedir. Bu mekanizma, DNA hasarı, onkogenik uyarılar ve mitojenik sinyaller ile indüklenebilmektedir (31).

Karsinogenez, birçok mutasyonun birikimi sonucu fenotipik ve genotipik düzeyde çok basamaklı olarak ilerleyen bir süreçtir. Farklı hücrelerde birbirinden bağımsız olarak biriken mutasyonlar, tümörü oluşturan hücrelerin heterojenitesine yol açar. Böylece,

tümörlerin çoğu monoklonal orjinli olmalarına rağmen, genellikle farklı karakterde subklonlar içerirler (32,33).

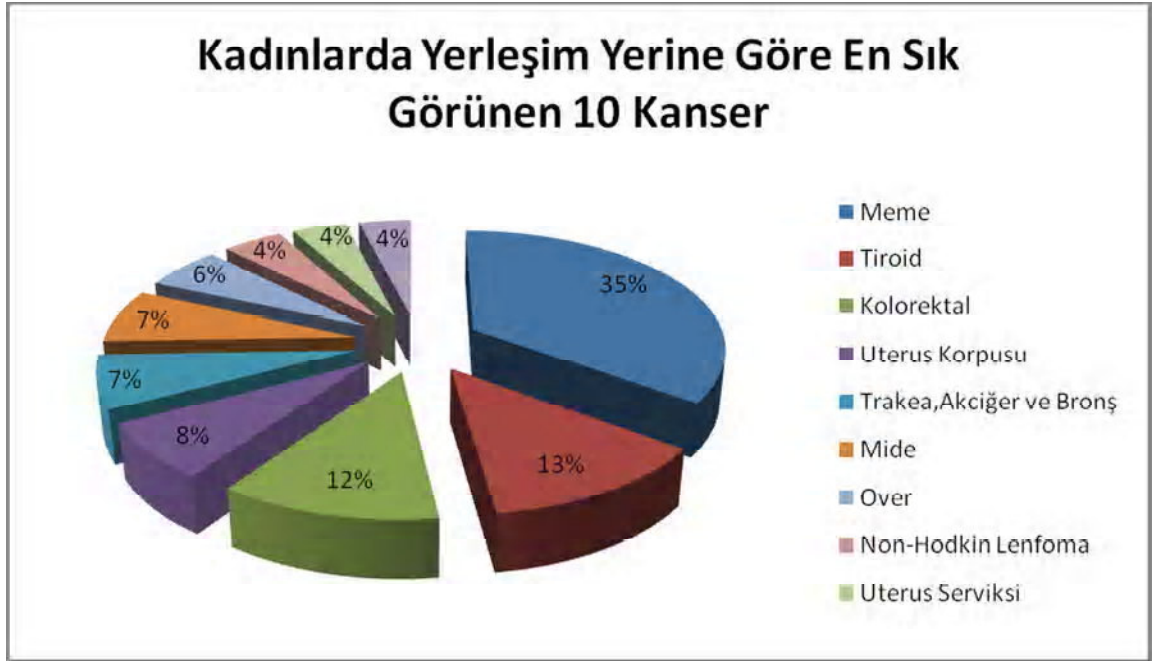
2.5.2. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser, Batı'da akciğer ve meme kanserinden sonra en çok ölüme neden olan malignite grubunu oluşturmaktadır. Yıllar içinde, birçok ülkede insidansında artış gözlenmiştir (34). Kolorektal kanser, bir dizi moleküler olay sonrası ortaya çıkan ve normal mukozadan tek bir kript epitelindeki değişikliklere, küçük iyi huylu tümörlerden (adenomatöz polipler) adenokarsinomlara kadar uzanan bir dizi morfolojik değişimle karakterize bir olgudur (35).

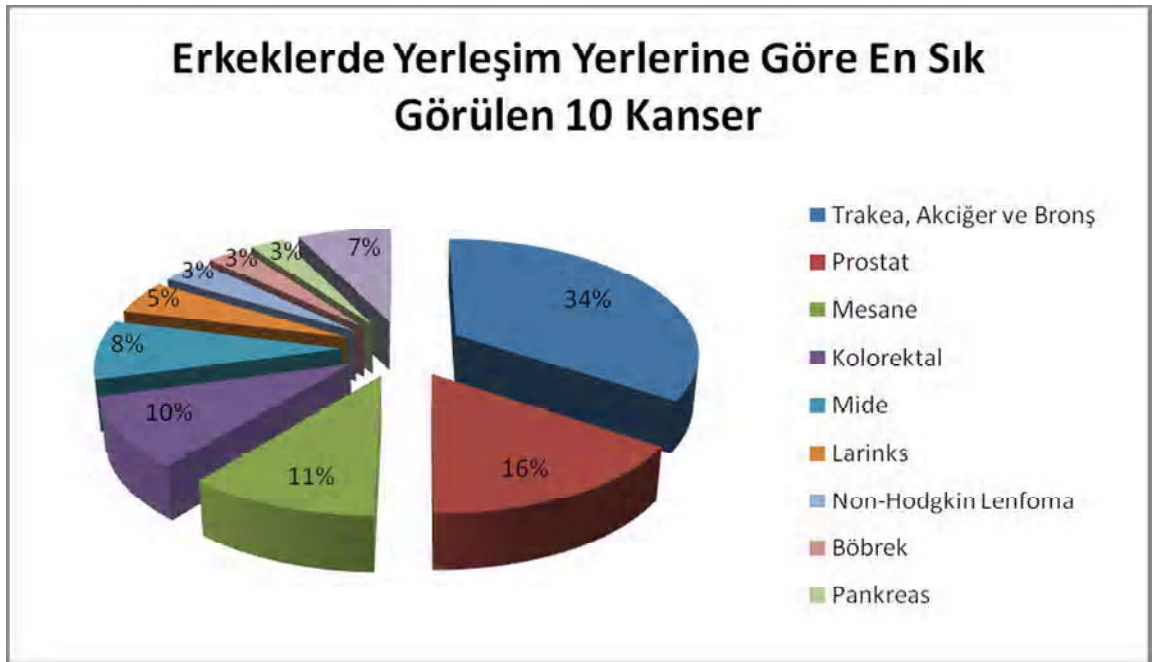
2.5.3. Epidemiyoloji

Gelişmiş ülkelerde üçüncü sıklıkta görülen kanser tipidir. Bütün kanserlerin yaklaşık %9'unu oluşturur (7-9). Kolorektal karsinomlar için her yıl tahmin edilen yeni vaka sayısı 150.000'dir. Hayat boyunca kolorektal karsinom gelişme riski yaklaşık % 6'dır ve bu oran erkeklerde kadınlardan daha yüksektir (10). Ortalama görülme yaşı 62'dir (11). Yaşla birlikte görülme sıklığı da artar. Pozitif aile anamnezi, kronik inflamatuvar barsak hastalığı vb gibi predispozisyonlar olmadıkça 40 yaş altında nadir görülürler. Proksimal kolon kanserleri siyah ırkta artış gösterirken, rektum adenokarsinomları beyaz ırkta daha sıktır (11,24,36-39). Gelişme riski 40 yaşından sonra erkek ve kadınlar için artmaktadır (10).

T.C. Sağlık Bakanlığının Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığının verilerine göre ülkemizde kanser sıklığı giderek artmaktadır. 2002-2009 yılları için, 41438 erkek, 27709 kadın olmak üzere, toplam 69147 olgu değerlendirilmiştir. Kadınlarda kanserin görülme sıklığının, özellikle 40-45 yaşından sonra, erkeklerde ise 55-60 yaşlarında arttığı belirlenmiştir. Ülkemizde kadınlarda kolorektal kanser, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009 yıllarında elde edilen verilere göre (Şekil 2.7) meme kanserinden sonra üçüncü en sık görülen kanserdir. Erkeklerde ise akciğer prostat ve mesane kanserinden sonra dördüncü (Şekil 2.8) en sık görülen kanserdir (40).



Şekil 2.7. Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanser Türünün Toplam Kanser İçindeki Dağılımı, (%), 2009, Türkiye (Kaynak: Halk Sağlığı Kurumu) (40).

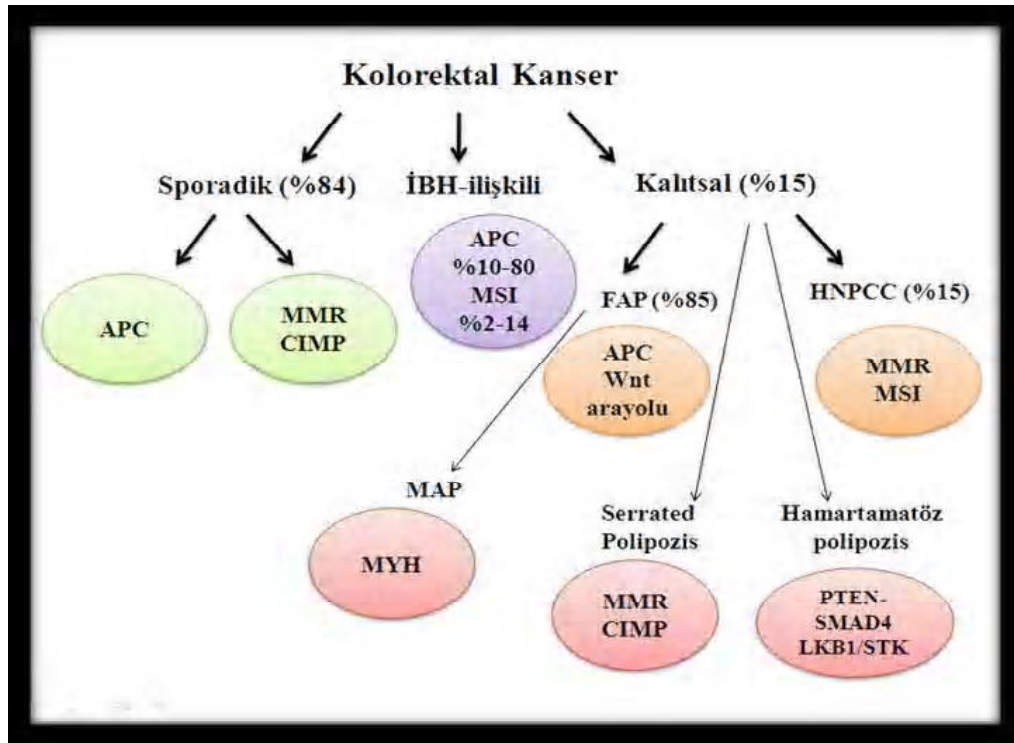


Şekil 2.8. Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanser Türünün Toplam Kanser İçindeki Dağılımı, (%), 2009, Türkiye (Kaynak Halk Sağlığı Kurumu) (40).

Kolorektal kanser görülme coğrafyası çok geniştir. En sık Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Yeni Zelanda, Avustralya gibi endüstriyel ülkelerde görülür. Ayrıca, ülke içinde de görülme sıklığı açısından farklı bölgeler mevcuttur. Örneğin Amerika Birleşik Devletlerinde, endüstriyel kuzeydoğuda oran en fazla iken, kırsal güneydoğuda en azdır. Japonya, Polanya gibi düşük riskli bölgelerden Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya gibi yüksek riskli bölgelere göç edenlerde kolon kanser oranları hızlı bir artış göstermektedir. Kolorektal kanser, gelişmişlik ve batılılaşmanın artışıyla çoğalmaktadır (8,41).

2.5.4. Etyoloji

Kolorektal karsinomlar sıklıkla displazik adenomatöz poliplerden gelişmektedir (42). Sağ kolon yerleşimli olanlar, kolorektal kanserlerin büyük bir kısmını oluşturmakta ve düşük riskli toplumlarda, yüksek riskli toplumlardan daha sık görülmektedir. Neoplastik gelişimde çevresel ve genetik etkiler değişik noktalarda gözlemlenirler. İyi tanımlanmış birkaç kolon kanseri sendromu, kolon kanseri patogenezinde genetik yatkınlığın önemli rol oynadığını göstermiştir (Şekil 2.9) (8).



Şekil 2.9. Kolorektal Karsinogeneze Etyolojik Yaklaşım (35).

2.5.4.1. Genetik Faktörler

Hereditär Nonpolipozis Kolon Kanseri Sendromları (HNPCC)

Ailesel kolon kanseri sendromlarının prototipidir. Otozomal dominanttır (8,10,11). Her yıl tanı konan kolorektal karsinomlarının %10'undan sorumludur (9). HNPCC iki sendromdan (Lynch family I ve Lynch family II) oluşur. Lynch I sendromu; otozomal dominant kalıtım, erken başlangıç, başlıca sağ taraf, sıklıkla birden çok, kolon kanseri gösterir. Lynch II sendromu; Lynch I sendromuna benzer ve ek olarak endometriyum, meme, over, mide kanserleri gibi, kolon dışı kanserlere, eğilim gösterir (8,10).

HNPCC için Amsterdam kriterleri tanımlanmıştır. Buna göre:

- Kolorektal kanser en az üç aile üyesinde olmalıdır.
- Üç aile üyesinden birisi, diğer ikisinin birinci derece akrabası olmalıdır.
- Birbirini takip eden en az iki nesil etkilenmiş olmalıdır.
- Etkilenen aile üyesinin en az birinde 50 yaşından önce kolorektal kanser gelişmelidir.
- Kanser tanısı patolojik olarak doğrulanmalıdır (8,10).

HNPCC, ailesel polipozis koli sendromundan beş kat fazla görülmektedir. Lynch II sendromlu hastaların birinci derece akrabalarında kolon kanser insidansı yedi kat artmıştır. HNPCC hastaları, sporadik kanserli hastalardan daha genç yaşta ortaya çıkar ve ortalama yaş erkeklerde 39 iken kadınlarda 37'dir (8).

Muir- Torre sendromu

Otozomal dominanttır. Lynch II sendromuna benzer. Kolon kanseri erken yaşta gelişir. Sağ taraf kolon kanseri daha sıktır ve sporadik kolon kanserinden daha iyi prognozu vardır. Bu hastalarda birden fazla deri lezyonu ve iç organ kanserleri gelişir (8).

Ailesel polipozis koli (FAP)

Otozomal dominant kalıtım gösterir (11). APC tümör supresör geninde mutasyon vardır (41). Sorumlu APC geni 5q21'de lokalizedir. Genellikle hayatın ikinci on yılında görülür. Radyografik ve makroskopik olarak bağırsakta normal mukozanın çok hafif kabarıklıklarından büyük kitlelere kadar değişen polipler vardır (9,11). Hastada birkaç polip FAP varlığını göstermez. En az 100 polip olmalıdır. Tedavi edilmeden bırakılırsa hemen hemen daima kalın bağırsakta bir veya daha fazla karsinom gelişir. Çoğu

karsinom üçüncü dekatta başlayacağından profilaktik kolektomi en geç 20- 25 yaşlarında yapılmalıdır (11).

Gardner sendromu

Otozomal dominant geçişlidir. Kalın bağırsakta adenomatöz poliplerle birlikte kafatası ve mandibulada birden fazla osteom, deride birden fazla keratinöz kist, özellikle fibromatozis olmak üzere yumuşak doku neoplazilerinin görüldüğü ailesel bir durumdur. Kalın barsak karsinomu gelişim potansiyeli ailesel polipozis kadar yüksektir (11,43).

Turcot sendromu

Otozomal dominant kalıtım gösterir. Kolorektal adenomatöz poliplerle birlikte genellikle glioblastom tipi beyin tümörleri vardır (11,43).

Peutz-Jeghers sendromu

Otozomal dominant bir sendrom olup LKB1 gen mutasyonu sebebiyle oluşur. Ağır derecede atipi gösteren adenomatöz poliplerin bazılarında kolorektal kanser gelişebilir. Bu sendromda pankreas, meme, akciğer, over ve uterus kanser gelişim riski artmıştır (11,43).

Cowden sendromu

Mukokutanöz lezyonlar (fasial trisilemmoma, akral keratoz ve oral mukozal papillom), kolorektal polipler ve değişik bölgelerde artmış malignite riski ile karakterize otozomal dominant bir hastalıktır. 10. kromozomda lokalize PTEN geninde mutasyon vardır (11,43).

2.5.4.2. Adenomlar

Kolon kanseri gelişiminin habercisi olan benign glandüler neoplazilerdir. Birden fazla ya da tek tek gözlemlenebilirler. Birden fazla olduklarında genetik bir sendrom ile ilişkilendirilebilirler. Adenomlar erkeklerde kadınlara oranla daha sık oluşur. Adenom insidansı 60- 70 yaşlarında en üst seviyeye ulaşır. Sağ kolon adenomları 65 yaş ve üzeri hastalarda lokalize olurken sol kolon adenomları ise genç hastalarda daha sık görülür (8).

Adenomlar makroskopik olarak; yassı (deprese), pediküllü (saplı) ve sesil (sapsız) olmak üzere üç sınıfa ayrılırken yapılarına göre tübüler, villöz veya tübülovillöz olarak

sınıflandırılır. Tübüler adenom %75'den fazla tubüler yapı, villöz adenom % 50'den fazla 12 villöz yapı, tübülovillöz adenom ise % 25- 50 villöz yapı içerir. En az oranda da villöz adenom görülürken en sık tübüler adenom görülür (8,41,43). Adenomlarda malignite riski epitel displazisinin derecesine, boyuta ve histolojik yapıya bağlıdır. Tanısal olarak düşük ve yüksek dereceli displazi, karsinoma insitu, intramukozal karsinom ve invaziv karsinomun tespiti önemli bir noktadır (8,43,44). Düşük dereceli displazide çok katlı displastik, silindirik epitel hücreleri vardır. Çekirdek oval veya iğsidir. Çok katlı çekirdekler epitel yüksekliğinin $\frac{3}{4}$ 'ü kadardır. Yüksek dereceli displazide epitel yüzeyine kadar gelmiş nükleuslar ve nükleositoplazmik oranı artmış hücreler mevcuttur. Hücreler pleomorfizm ve polarite kaybı nedeniyle silindirikten yuvarlağa dönerler. İntraepitelyal karsinoma (karsinoma insitu)'da malign hücreler bazal membrana sınırlıdır. İntramukozal karsinomda neoplastik hücrelerin bazal membrandan lamina propriaya geçiş gözlenirken invaziv karsinomda da muskularis mukozadan submukozal bölgeye geçiş vardır. Yüksek dereceli displaziler klinik açıdan bening lezyon yapısında olmalarıyla birlikte metastaz yapmazlar (8,43).

Lenfatik kanallar kolon mukozasında yok kabul edilir. Nadiren lamina propria bazalinde izlenirler. Bundan dolayı intramukozal karsinom malign potansiyeli yok veya çok az kabul edilir (43). Patologlar kronik ve aktif enflamatuvar hastalıkta oluşan reaktif değişiklikleri displaziden ayırmada bazen zorlanmaktadırlar (8,11,45). Reaktif enflamatuvar durumda açık renk kromatin yapısı ve sitoplazmik müsin azlığı vardır. Ayrıca yüzeyde maturasyon görülür. Sitoplazmanın yoğun eozinofilik olması, reaktif veya rejeneratif epitelyumyal hücreler için karakteristiktir ve glandüler yapı da korunmuştur. Aktif enflamasyonun bu bulguları displazide görülmez. Displazilerde de enflamasyon bulunabileceğinden şüpheli enflamasyon, agresif medikal tedavi ile azaltılmalı ve tekrar biyopsi önerilmelidir. Tedaviden displazi etkilenmeyecektir 45).

2.5.4.3. Diyetle Bağlı Faktörler

Çevresel faktörler özellikle de beslenme alışkanlıkları ülkeler arasındaki insidans farklarından sorumlu tutulmuştur. Karbonhidrat ve yağ oranı yüksek, bitkisel lif oranı oldukça düşük olan, antioksidan içermeyen, vitamin ve eser elementlerden yoksun bir beslenme tarzı kolorektal kanser gelişiminde etkili olmaktadır (11,23,37-39).

Yüksek yağ oranı içeren diyetler kolon kanseri riskini artırırken hayvansal protein içeren kırmızı et tüketimi kolon kanserinde bağımsız faktör olarak belirlenmiştir

(8,10,11,41). Balık, kümes hayvanları gibi düşük oranlı yağ içeren ürünlerin tüketimi tavsiye edilmektedir (10,46). Antioksidan vitamin kaynağı olan lifli, yeşil yapraklı sebzeler ve meyveler kanser oluşumunu engellemektedir (8,11). C vitamini, tokoferol ve selenyum bağırsak epitelyumunu kuvvetli mutajen olan fekapentanlardan ve diğer karsinogenik (oksidatif) tahribattan korur. C vitamini nitritlerin nitrosamine ve nitratlara dönüşümüne engel olan bir antioksidandır. E ve C vitaminleri polipektomi sonrası rektal adenom tekrar sayısını azaltırlar. Sarımsak kolon kanseri riskini, detoksifiye enzim içermesi, tümör çoğalmasına engel olması ve antibakteriyel aktivitesi ile güçlü bir biçimde tersine çevirir (8). Yeşil çay ve kahve, kolon kanseri gelişimine karşı koruyucu olabilirken alkol alımı DNA da anormal metilasyonlara sebep olacağından kolon kanseri ve adenom görülme riskini artırır (8,46).

2.5.4.4. Obezite

Özellikle abdominal yağlanma ve artmış vücut kitle indeksi kolon kanseri riskini ve kanserden ölümleri arttırmaktadır (8,46). Fazla kilolu ve fiziksel olarak inaktif erkeklerde kolon kanseri gelişimi riski yüksektir (8,42).

2.5.4.5. Sigara Kullanımı

Tütün kullanımı rektal kanser ve adenom insidansını önemli ölçüde arttırmaktadır. İlk kullanım yaşının erken olması ve yıllık paket sayısı kanser riskini artırır (8,41).

2.5.4.6. Radyasyon

Radyasyon kolon kanserinin az bir miktarında etyolojik yol oynar. Diğer kanser tiplerinden servikal, uterus veya prostat karsinomlarının tedavisi için radyo terapi uygulanan hastalarda rektal kanser gelişiminin sıklığı bildirilmiştir (8).

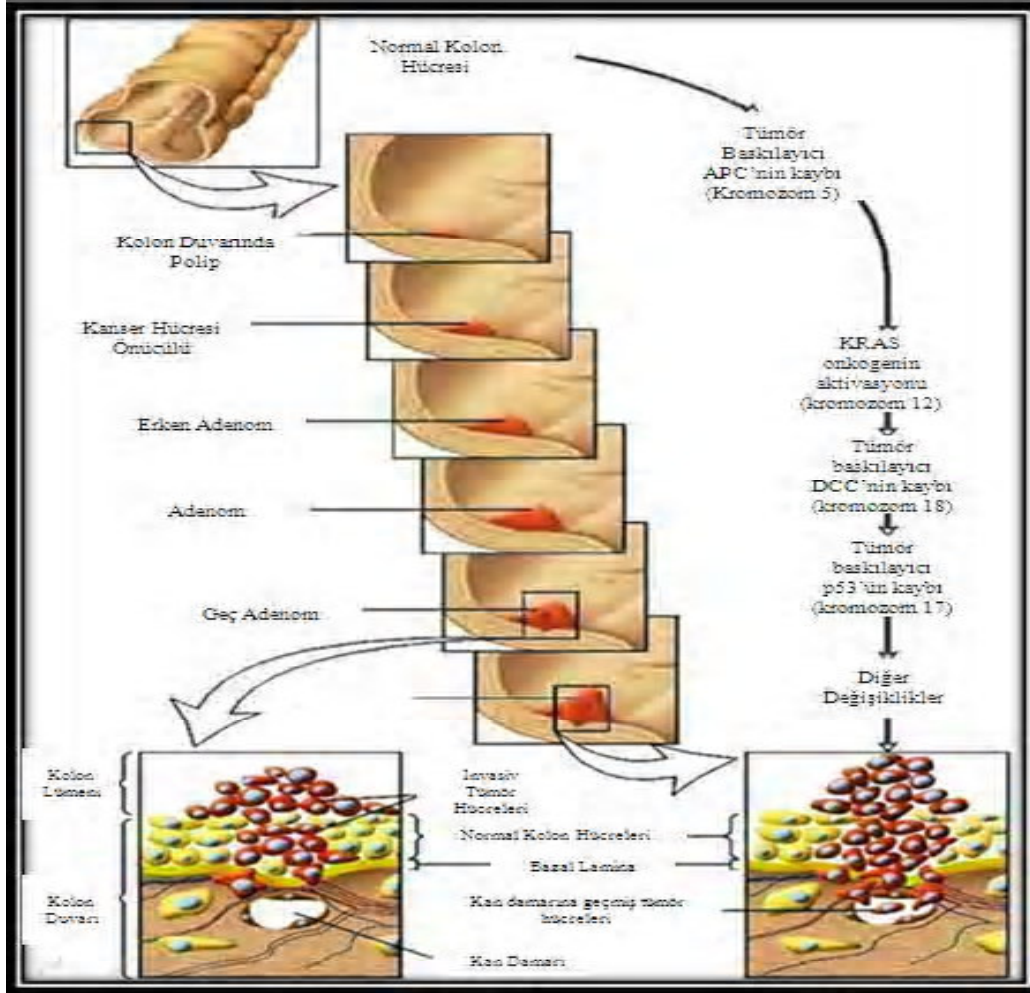
2.5.4.7. Diğer Faktörler

Üreterosigmoidostomi uygulanan hastalarda kolon kanseri insidansı 500 kat artar. Peptik ülser için cerrahi tedavi geçiren hastalarda, pernisiyöz anemi, diabetes mellitus, çöliak hastalığı, AIDS hastalarında kolorektal adenokarsinom riski artmış olabilir (8).

2.5.5. Kolorektal Karsinogenez

Kolorektal karsinogenez, normal hücrenin malign hücreye dönüşümünde genetik ve epigenetik değişikliklerin gerçekleştiği çok basamaklı bir oluşumdur (Şekil 2.10). Bu

oluşumda her basamakta farklı lezyonlar oluşur ve böylece moleküler değişimlere farklı morfolojik lezyonlar eşlik etmektedir (47,48,49)

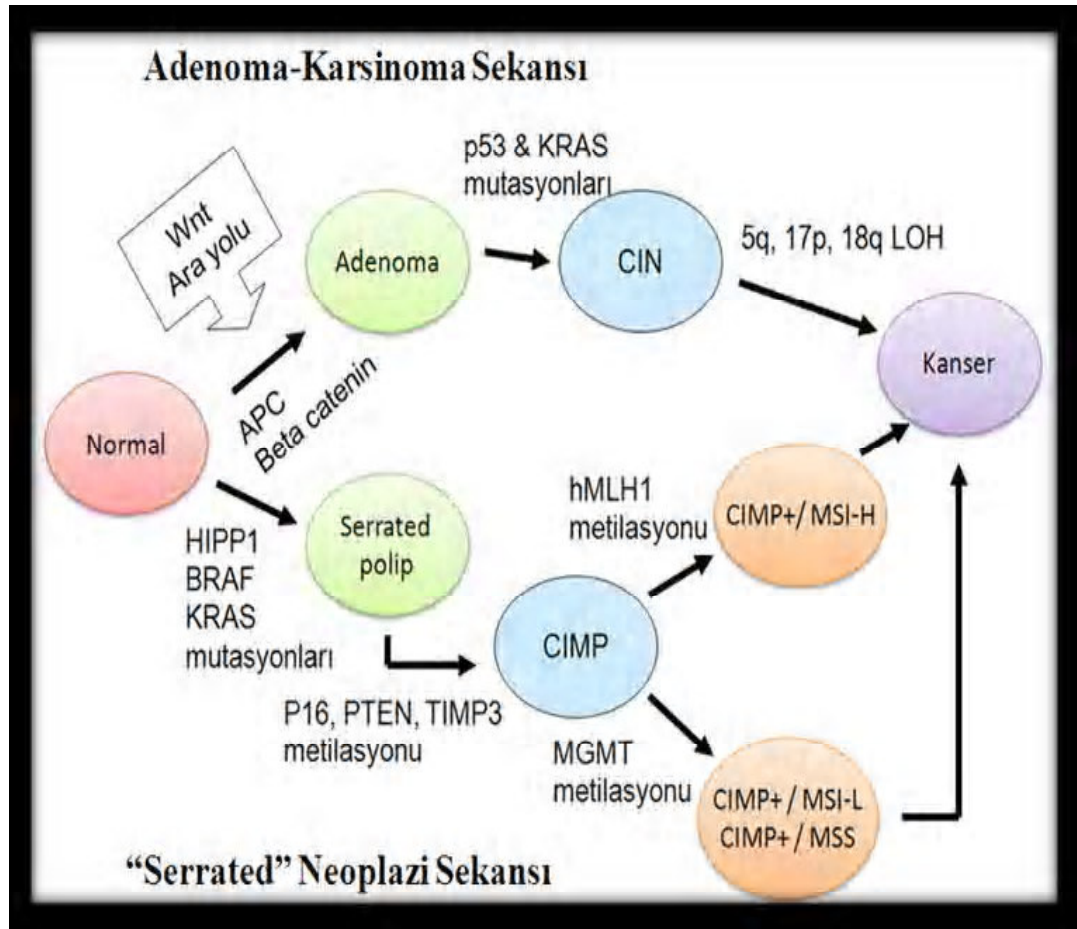


Şekil 2.10. Fearon ve Vogelstein'in Tanımladığı Kolorektal Karsinogenez Modeli (30).

2.5.5.1. Kolorektal Karsinogenezde Moleküler Ara Yollar

Kolorektal karsinogenezde, patogenetik olarak birbirinden farklı üç ara yol yer almaktadır. Bu ara yolların her birinde, birden fazla mutasyonun aşamalı olarak birikimi söz konusudur (Şekil 2.11). Ayrıca, bu ara yollarda yer alan genler ve oluşan mutasyonların birikim mekanizmaları birbirinden oldukça farklıdır (50).

Kolorektal karsinomlarının %75'inin, Fearon ve Vogelstein'in tanımladığı kromozomal instabilite ara yolu, % 15'inin mikrosatellit instabilite ara yolu üzerinden geliştiğini göstermektedir. Diğer üçüncü arayolun bu iki arayola da ilişkisi olmayıp, CpG ada metilasyon fenotipi arayolu üzerinden gelişebileceğini göstermektedir (51,52).



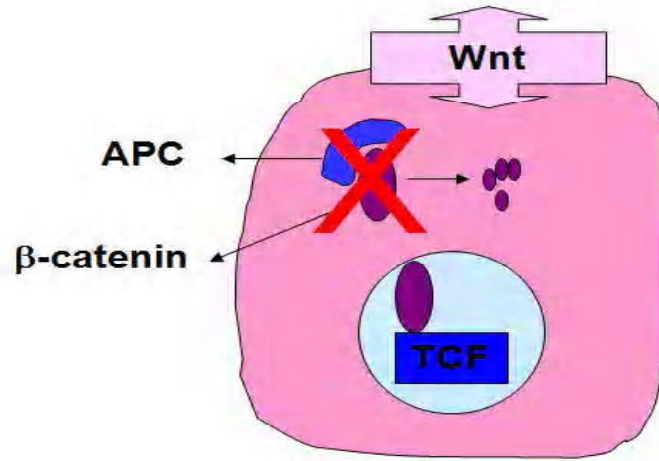
Şekil 2.11. Kolorektal Karsinogenezde Multistep Moleküler Gelişim Modeli (50).

2.5.5.1.1. Kromozomal İnstabilite ("Chromosomal Instability: CIN") Ara Yolu

Kolon kanserinde genomik instabilitenin en yaygın tipi olan CIN arayolu aynı zamanda supresör yolak olarak da bilinir. Çeşitli onkogen ve supresor genlerde görülen seri mutasyonların birikimi sonucu oluşmaktadır. Delesyon, duplikasyon, kromozomal rearanjman gibi anöploidi ile sonuçlanan genetik değişiklikler içermektedir. Kolorektal tümörlerin %75'inde görülmektedir (49,51,52). Bu arayolun morfolojik karşılığı ise adenoma-karsinoma sekansıdır.

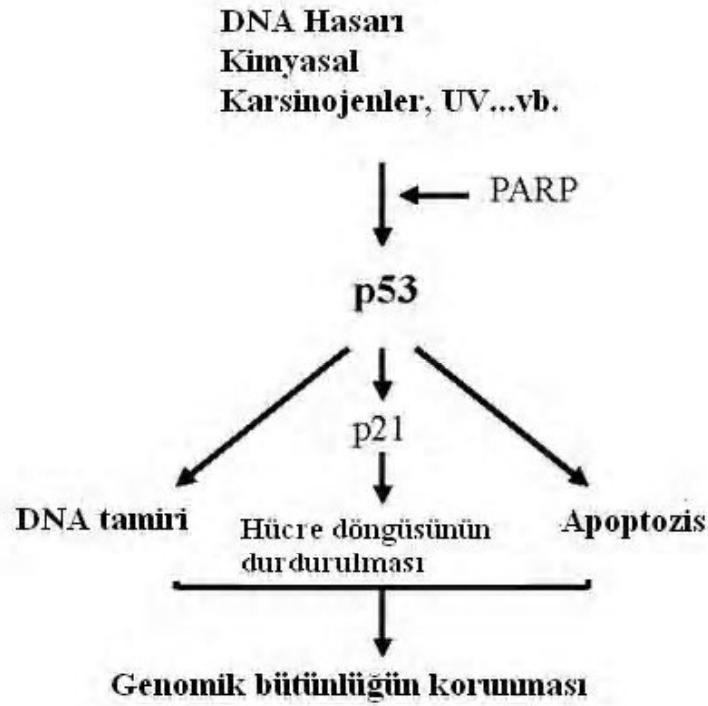
Fearon ve Vogelstein'in tanımladığı adenoma-karsinoma modeline göre, adenom gelişiminde, erken dönemde, APC tümör supresör gen mutasyonları gözlenirken, daha ileri evrede KRAS mutasyonları ve maligneteye geçişte ise p53 mutasyonu ile 18q delesyonu söz konusudur (53).

Bu ara yolda WNT, p53, RAS-MAPK ve TGF- β /SMAD olmak üzere 4 önemli sinyal iletim yolağı vardır. WNT sinyalleri, normal olarak büyümenin regülasyonunda, apoptozda, intestinal kök hücrelerin farklılaşmasında ve kısmen embriyogeneizde etkilidir (54). WNT sinyal ara yolunda yer alan APC (adenomatöz polipozis koli) proteini, β -katenini parçalayarak sitoplazmadaki miktarını azaltır ve nükleusa geçini engelleyerek büyüme sinyalini durdurur (Şekil 2.12). APC genindeki “germline” mutasyonlar sonucu FAP sendromu ortaya çıkmaktadır. Sporadik kolorektal kanserlerin %80’inden fazlasında ise somatik hücrelerde APC gen mutasyonu saptanmıştır (55,56).



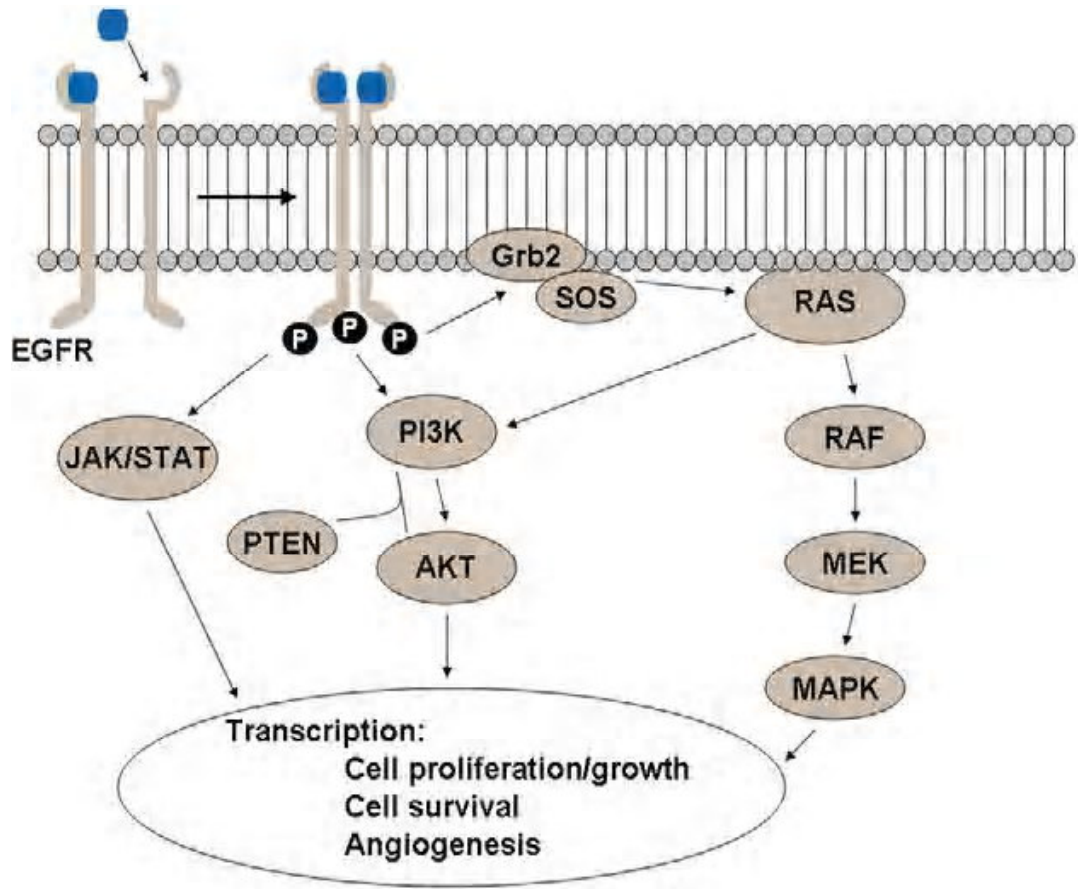
Şekil 2.12. Wnt Ara Yolunda APC β -katenin İlişkisi (55).

p53 mutasyonu, insan tümörlerinin yaklaşık %50’sinde görülmekle birlikte, p53’de heterozigotluk kaybı hemen her kanser tipinde ortaya çıkmaktadır (33). p53 proteini normal hücre siklusunu kontrol etmez, ancak, DNA zedelenmesi durumunda ekspresyonu artar ve DNA’ya bağlanarak pek çok genin transkripsiyonunu stimüle eder. Hücre siklusu durunca p53 DNA onarımına yardımcı proteinlerin ekspresyonunu artırır ya da hasar onarılamadıysa hasarlı hücreyi apoptoz ile (Şekil 2.13) ortadan kaldırır (57).



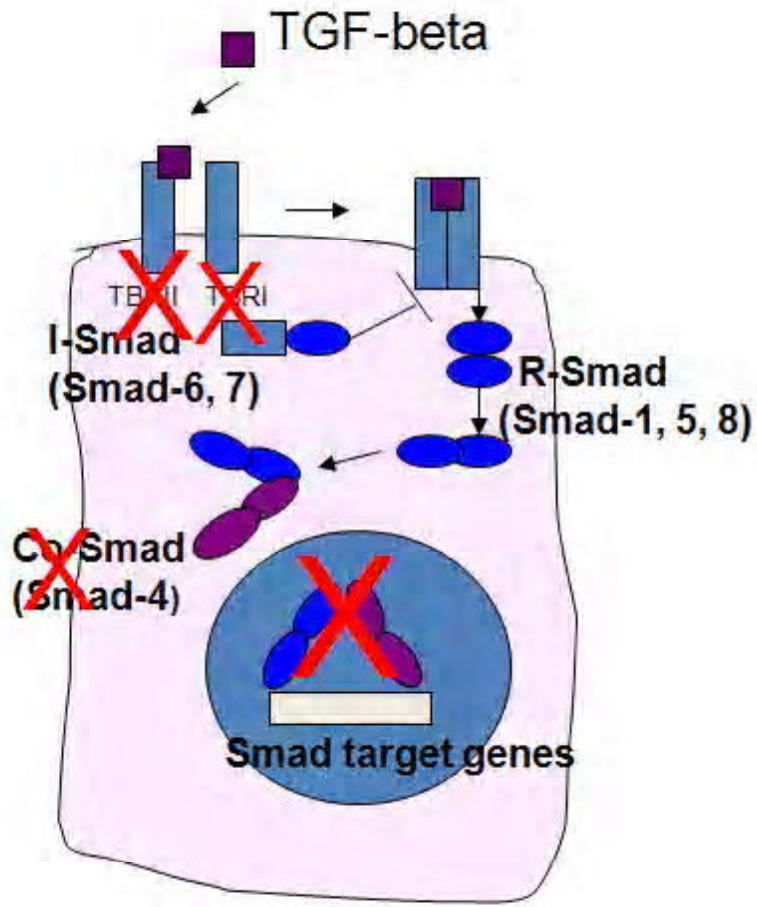
Şekil 2.13. p53 Ara Yolu (57).

Hücrede çeşitli hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiyasyon faktörleri tarafından kullanılan RAS-MAPK sinyal ara yolu RAS proteininin aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla RAF, MEK ve ERK proteinleri aracılığıyla bir kinaz kaskadı oluşur. Ras proteininin aktif hale geçmesi için posttranslasyonel modifikasyondan sonra membrana yerleşmesi gerekir. Hücreye büyüme sinyali geldiğinde, Ras-GTP haline dönüşür. Aktif olan RAS, RAF proteinini harekete geçirerek mitogenez sürecini başlatır (Şekil 2.14). RAS proteini, normal dokuda proliferasyon, diferensiyasyon ve senesens sinyallerinde önemli bir role sahipken, mutant genin oluşturduğu RAS proteini, birçok kanser tipinde etkili potansiyel onkogenik bir proteindir (58). Tüm insan tümörlerinin %17-25'inde, kolorektal tümörlerinse %30-40'ında aktive edici KRAS mutasyonu tanımlanmıştır (59,60). BRAF proteini, RAS proteini tarafından stimüle edilen ve RAS-MAPK sinyal ara yolunda görev alan bir diğer moleküldür. Tüm insan tümörlerinin %8'inde, kolorektal tümörlerinse %5-12'sinde BRAF mutasyonu rapor edilmiştir (61,62). Ayrıca yanlış eşleşme tamir sistemi defektli olan kolorektal kanserlerde, defekti olmayanlara göre çok önemli ölçüde BRAF mutasyonu görülmektedir. Bu nedenle BRAF mutasyonu ile mikrosatellit instabilitesi arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir (62,63).



Şekil 2.14. RAS-MAPK Sinyal Ara yolu (58).

TGF- β , epitelyal hücreler için proliferasyon inhibitörü olarak işlev görmektedir (Şekil 2.15). Hücrede TGF- β 'nın büyüme inhibitör etkisine karşı oluşan duyarsızlık sonucu tümör gelişimi gözlenir (64). TGF- β sinyal ara yolunda yer alan ve bir tümör süpressör gen olan SMAD geni, büyümenin regülasyonunda ve apoptozda etkilidir (49,64). Apoptozda SMAD geni gibi etkili olan bir diğer gen DCC (deleted in colon cancer) geni de SMAD geni gibi apoptozda etkilidir. Bu genin mutasyona uğraması durumunda hücrenin apoptoz mekanizmasında aksaklıklar yaşanır (49).



Şekil 2.15. TGF-β/SMAD Ara Yolu (64).

2.5.5.1.2. Mikrosatellit İnstabilite (MSI) Ara Yolu

DNA yanlış eşleşme tamir (“mismatch repair system, MMR”) genlerindeki mutasyonlar sonucu oluşan mikrosatellit instabilite ara yolu (MSI), mutatör ara yol olarak da bilinir. Genom boyunca yer alan kısa nükleotit tekrarlarına mikrosatellit denir. Hücre bölünmesi anında replikasyon sırasında bu tekrar dizilerinin olduğu kısımlarda DNA polimeraz hata yapabilir. Bu durum replikasyon hatası (“replication error, RER”) olarak adlandırılır. Hata, bir tekrarın atlanması, yanlış baz eklenmesi ya da fazla sayıda tekrar dizisi eklenmesi şeklinde olabilir. Normal şartlarda, DNA polimeraz 3’-5’ ekzonükleaz aktivitesi ile yanlış eşleşmeler düzeltilirken, onarımdan kaçabilen bu alanlar, yanlış eşleşme tamir sistemi aracılığıyla onarılır ve böylece DNA MMR genleri sayesinde

replikasyon sürecinde genomik stabilizasyon sağlanır. Ancak MMR genlerinde bir mutasyon olması durumunda MSI olarak bilinen durum ortaya çıkar (65,66). Kolorektal tümörler, mikrosatellit instabilitesi açısından mikrosatellit-stabil (MSS), yüksek mikrosatellit instabil (MSI-H) ve düşük mikrosatellit instabil (MSI-L) olmak üzere 3 grupta değerlendirilmektedir. MSS tümörlerin genetik profili, MSI-L ile çok benzerdir, ancak, MSI-H tümörler oldukça farklı bir profil sergilerler. MSI-L tümörler, sol kolon yerleşimli ve en az MSS tümörler kadar agresif bir gelişim paternine sahiptir. Bu grupta en sık görülen genetik değişiklikler, KRAS ve p53 mutasyonları ile 5q, 17p ve 18q lokasyonlarında heterozigotluk kaybı olmakla birlikte, en karakteristik özellikleri bazı DNA MMR genlerinin kısmi metilasyonu ile genin susturulması ve O(6)metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) geninin metillenmesi sonucunda protein ekspresyon kaybıdır (50).

Lynch Sendromu olarak da bilinen Herediter Non-Poliposis Kolorektal Kanseri (HNPCC) Sendromu seyrinde ortaya çıkan tümörlerin %90'ı, sporadik kolorektal tümörlerin ise %15-20'si MSI-H olarak tanımlanmıştır. Böylece, mikrosatellit instabilitesi için, HNPCC'de görülen MSI-H ve sporadik olarak görülen MSI-H kolorektal kanserler olmak üzere 2 farklı mutasyon gelişim modeli tanımlanmıştır (47,67,68).

Tüm kolorektal kanserlerin % 5'ini oluşturan HNPCC sendromu, otozomal dominant kalıtım göstermekle birlikte, "germline" mutasyon ya da yabanıl tip olan alelin inaktivasyonu ile tümör gelişimi gözlenmektedir. "Germline" mutasyon durumunda, DNA yanlış eşleşme tamir genleri MSH2, MLH1, MSH6, MSH3, PMS2, PMS1, MLH3'de delesyon ya da nokta mutasyonu şeklinde genetik değişiklikler mevcuttur. Yüksek penetransa sahip olan bu genlerde mutasyon taşınması, kolorektal kansere yakalanma riskini %80 artırmaktadır (68). Yabanıl tip alelin inaktivasyonu durumunda ise, MMR genlerinden biri mevcut "germline" mutasyon ile heterozigot durumdadır. Knudson'un iki hit hipotezindeki fenotipik etkiye göre, MMR genleri tümör süpresör gen gibi davrandığından otozomal dominant kalıtım göstermektedir. Diğer alelin (yabanıl tip alelin) inaktive edilmesi ile heterozigotluk kaybı ("loss of heterozigoty", LOH) olarak tanımlanan durum ortaya çıkmakta ve böylece, mikrosatellit instabilitesi oluşmaktadır (35,69).

MSI-H sporadik kolorektal kanserlerin %90'ında MMR geninin promotor bölgesinde bialelik metilasyon ya da tek alelde hipermetilasyon ile tümör gelişimi gerçekleşmektedir. Genin promotor bölgesinde bialelik metilasyon olması durumunda yabancı tip olan her iki alelin metilasyonu ile gen tamamen susturulur ve protein ekspresyonu olmaz. Tek alelde hipermetilasyon olması durumunda ise, yabancı tip olan her iki alelden birinin metile edilmesi ile gen ekspresyonu baskılanarak azaltılır.

MSI arayolundan gelişen kolorektal kanserlere, genellikle serrated poliplerin öncülük ettiği düşünülmekle birlikte, Lynch sendromunda adenom öncülüğünde ya da “de novo” kanserleşme olabileceği görüşü kabul edilmektedir (66).

2.5.5.1.3. “CPG” Ada Metilator Fenotipi (“CIMP”) Ara Yolu

“CpG” adaları, yüksek oranda guanin-sitozin (“guanine-cytosine: GC”) dinukleotidleri içeren ve çoğunlukla genin promotor kısmında yer alan genom bölgeleridir. Tüm genomun %1'ini oluştururlar. “CpG” adaları, genlerin promotor bölgelerinde, 5' uçlarında görülür ve birçoğu transkripsiyon bağlanma bölgesi içerir (70,71). İnsan promotorlarının %60'ından fazlasında “CpG” adasının yer aldığı saptanmıştır. Promotor bölgelerde görülen “CpG” adaları, normal koşullarda aktif olan bir gende metillenmemiştir. Bu bölgelerin metillenmesi sonucu ilgili gen susturulur ve protein ekspresyonu gerçekleşemez (72). DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilen enzimatik bir modifikasyondur. Sitozin nükleotidine metil grubunun bağlanması “G-C” baz eşleşmesini etkilemez. Ancak metil gruplarının dışarı doğru çıkıntı yapması, transkripsiyon için gerekli DNA-protein etkileşimini engellediği için gen ifade edilemez ve böylece gen susturulmuş olur. Bu durum, mitoz bölünmeler ile yeni hücrelere de aktarılır. Bu nedenle, CpG adacıklarının metilasyonunun, epigenetik (gen ifadesindeki değişikliklerin, DNA sekansı ile bağlantı göstermeksizin, hücre bölünmesi boyunca bir nesilden diğerine aktarılması) bir durum olduğu düşünülmektedir (73,74).

“CIMP” arayoluyla gelişen kolorektal tümörler mikrosatellit instabil ya da stabil olabilir. Bu tümörlerin çoğu, serrated neoplazi sekansında, serrated poliplerden gelişmektedir (52). Kolorektal karsinomların %20'sinin “CpG” hipermetilasyonu, %20'sinin düşük düzeyde “CpG” metilasyonu gösterdiği %60'ının ise “CpG” metilasyonu göstermediği izlenmiştir (51,52). Kolorektal karsinomların CIMP durumu, genellikle MSI durumu, KRAS ve BRAF mutasyonları ile ilişkilidir. Buna göre, MSI-H

ve BRAF mutasyonu gösterenler, CIMP1 grubu, MSS ve KRAS mutasyonu olanlar ise CIMP2 grubu olarak değerlendirilmektedirler. CIMP (-) olanlar ise genellikle MSS kanserlerdir (50).

2.5.5.2. Kolorektal Karsinomların Lokalizasyonu

Kolorektal karsinomların yaklaşık %50'si rektosigmoid bölgede yer alırken %30'u sağ kolonda geri kalanı da kolonun diğer kısımlarında lokalize olmuştur . Ancak son yıllarda ras protoonkojen mutasyonlarını yüksek oranda içeren tümörlerin çekum, çıkan kolon ve transvers kolonda yerleşme eğiliminde olduğu görülmektedir. Yine buna benzer şekilde sağ kolonda lokalize olan tümörler ileri yaşlarda, siyahlarda ve divertikuler hastalığı olanlarda daha sıktır. Kolorektal karsinomların %3-6'sı multisentrik olarak gelişebilir (11,24,36,37).

2.5.6. Klinik Bulgular

Kolorektal karsinomların görülme sıklığı 50 yaş üzerinde giderek artar. Maksimum görülme sıklığı ise 80 yaştır. Ortalama yaş erkeklerde 63, kadınlarda 62'dir. Cinsiyet açısından belirgin bir fark olmamakla birlikte erkeklerde biraz daha sık görülür (11,75).

Primer tümörün yerleştiği lokalizasyona göre ortaya çıkan klinik bulgular, tümörün sağ veya sol kolon yerleşimine ve lezyonun erken veya ilerlemiş olup olmasına göre değişir. Başlangıç semptomları genellikle belirsiz ve nonspesifiktir. Kilo kaybı ve iştahsızlık sıklıkla oluşur. Çekum ve çıkan kolon kanserleri sıklıkla yassı veya polipoiddir. Sağ kolon tümörlerinde lümen geniş, feçes daha sıvı kıvamlı ve tümör sıklıkla egzofitik büyüme gösterdiğinden obstruktif bulgular sık değildir. Sağ kolon tümörleri daha çok dışkılamayla birlikte genellikle fark edilmeyen kronik kan kaybından kaynaklanan yorgunluk, halsizlik ve çarpıntı ile sonuçlanan demir eksikliği anemisi ile kendini göstermektedir. Bundan dolayı sağ kolon kanserleri, melena ve tıkanıklık oluşturmazlar, sıklıkla klinik olarak sessiz kalırlar. Tümör sol kolonda yerleşmiş ise; lümenin darlığı, feçesin sert olması, tümörün daha çok anüler tarzda büyümesi nedeniyle konstipasyon bulguları sık görülür (8,9,11,36-38,75,76). Hastaların yaklaşık %50'sinde başlangıç semptomu olan rektal kanama, göz ile görülmeyebilir. Bu durum sadece demir eksikliği anemisi ile fark edilir (8,11,77).

Yaklaşık %50 hastada abdominal ağrı şikayeti olabilir. Özellikle tümör serozayı invaze ettiğinde ortaya çıkar (8). İlioçekal valvdeki karsinomların % 25 i apendiks lümenini tıkayarak apendisite sebep olabilirler (8,11).

Erken Tanı ve Klinik Tarama Metotları

Son yapılan çalışmalar, uygun tarama ve tedavinin kolorektal kanseri ve bu maligniteden ölüm sayılarını azalttığını göstermiştir. Adenomatöz poliplerin bulunması ve çıkarılması kolorektal adenokarsinom gelişimini önleyebilirken erken evre kanserlerin tanı ve tedavisi de kolorektal kanser mortalitesini azaltır. Polip ve erken evre kanserler genelde asemptomatiktir (8,10,11).

50 yaşından sonra kişiler kolorektal kanser riski taşıdıklarından dolayı, malignite ve polip açısından düzenli olarak taranmalıdır. Tavsiye edilen tarama yöntemleri şöyledir:

- 1- Senede bir defa gaitada gizli kan testi
- 2- Her beş yılda bir fleksibl sigmoidoskopi
- 3- Her 5-10 yılda bir çift kontrastlı baryum enema
- 4- Her on yılda bir kolonoskopi

Gaitada gizli kan testi spesifik değildir. Birçok küçük kanser ve prekanseröz lezyonu bulmada yetersizdir. Bazı uzmanlar senede bir bu teste beş yılda bir fleksible sigmoidoskopinin eşlik etmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Fleksible sigmoidoskopi ile bulunan adenomatöz polip sonucu kolonoskopi ile tüm bağırsağın muayenesini gerektirir. Çift kontrastlı baryumlu grafiler; 1 cm'den küçük polipleri %50-80, 1 cm'den büyük polipleri %70-90 ve evre I ve II adenokarsinomları %50-80 oranında tespit etmektedir. Birinci derece akrabalarında kolorektal kanser veya adenomatöz polip hikayesi olanlarda tarama 40 yaşında veya akrabanın tanı aldığı yaştan 10 yıl önce başlamalıdır. Kolonoskopi ile tüm kolonun değerlendirilmesi gerekmektedir. HNPCC'de tarama 21 yaşında başlamalıdır. Bir veya üç yılda bir kolonoskopi, genetik danışma ve genetik testlerin uygulanması söz konusudur (77).

FAP'da tarama pubertede başlamalı; her bir-iki yılda bir fleksible sigmoidoskopi veya kolonoskopi, genetik danışma, genetik test yapılması uygundur. İnflamatuvar barsak hastalıklarında özellikle ülseratif kolitte kolorektal kanser riski artmıştır (8,11,77).

Crohn hastalığında da risk artmakla beraber iyi bir şekilde tanımlanmamıştır. Ülseratif kolitte pankolit tanısından 7-8 yıl sonra, sol taraf kolitin tanısından 12-15 yıl sonra tarama başlamalıdır. Tarama, her bir- iki yılda bir diplazi için kolonoskopi ile biyopsi alınmalıdır (77).

2.5.7. Makroskopik Bulgular

Kolorektal karsinomların büyük bir kısmı polipoid veya ulseratif/infiltratif tiptedir. Polipoid tipte olanlar lümeneye doğru büyüme gösterirler. İyi sınırlı, normal kolon mukozasıyla keskin sınırlar oluşturan büyük kitleler şeklindedirler ve daha çok sağ kolonda yerleşirler. İnfiltratif olanlar ise yüzeyden daha az kabarıktır ve santral ulserasyon alanı bulunur. Daha çok sol kolonda izlenirler. Bu tümörlerin adenomun malign transformasyonundan çok de-novo geliştikleri düşünülür. Genelde, tümörün makroskopik ve mikroskopik sınırları arasında iyi bir korelasyon vardır. Kesit yüzü barsak duvarının yerini almış gri-beyaz görünümündedir. Sınırlar, keskin ya da ana kitleden parmaklı çıkıntılar gösteren düzensizlikte olabilir. Yüksek derecede musin içeren tümörler jelatinöz ve parlak görünümündedir. Tümörün duvarda sınırlı olup olmadığı, perikolik dokuya uzanıp uzanmadığı, makroskopik damar invazyonunun varlığı ve diğer alanlarda herhangi bir tip karsinom ya da polip bulunup bulunmadığı makroskopik incelemede değerlendirilmesi gereken önemli özelliklerdendir (11,36,38,39,75,78).

2.5.8. Mikroskopik Özellikler

Histopatolojik Grade:

Kalın barsak tümörlerinin %95'i klasik adenokarsinomdur. (8,11) Bunlar değişik derecede musin salgılayan iyi, orta ve az gradede diferansiye adenokarsinomdur (11).

Goblet hücreleri, kolumnar hücreler, seyrek endokrin hücreleri ile birlikte nadir olarak da Paneth hücrelerinin bir araya gelişiyle tümör hücreleri oluşur. Gland lümenleri sıklıkla hücre kalıntıları içerir. Karsinomlar özellikle tümör çevresinde belirgin olan daima inflamatuvar ve desmoplastik reaksiyon oluştururlar. İnflamatuvar hücrelerin büyük bir kısmı T lenfositlerdir fakat B lenfositler, plazma hücreleri, histiositler ve S-100 protein pozitif dentritik hücreler de görülebilir. Nadiren, interlekin 5 üretimine bağlı çok sayıda eozinofil görülebilir. Tümör barsak duvarının tüm katlarını tutup perikolik yağlı

dokuya ulaşmış, perinoral alanları ve venleri invaze etmiş olabilir. Nadiren tümör stroması metaplastik kemik oluşumu gösterebilir (11,36,39).

Tümör kenarları odaklar halinde reziduel polip içerebilir; fakat bu bölgede glandlardaki hiperplastik değişiklikler daha sık bir bulgudur. Bu glandlar uzun, daha kıvrıntılı ve normal mukozadan daha çok goblet hücresi içerirler. Müsin sekresyonunda da değişikliklerin izlendiği bu bölge transisyonel mukoza olarak adlandırılır. Bu muhtemelen malign lenfoma ve metastatik karsinom gibi diğer tümörlerin kenarlarında ya da anastomoz alanlarında olduğu gibi tümör dışı durumlarda da görülebilen reaktif bir değişikliktir (11,37-39,78).

Diğer Histolojik Tipler:

Müsinöz Karsinom: Kolorektal karsinomların %10-15'ini ve rektal kanserlerin %33'ünü oluşturur (8,11). WHO'ya göre tümörün %50'den fazlası müsin içerdiğinde müsinöz karsinom tanımlaması yapılabilmektedir (11,41,79). Müsinöz karsinom en sık rektumda (%61.5) ve sigmoid kolonda (%15.3) gözlenir (25). Bazı vakalarda hücre içi ve hücre dışı müsin karışık halde bulunur. Hücre içi müsin oluşumu taşlı yüzük yapısına sebep olur. Müsinöz karsinomları klasik karsinomlardan ayıran klinik ve patolojik özellikler vardır. Bu tümörler sıklıkla genç ve HNPCC hastaları etkiler. Prognoz klasik adenokarsinomdan daha kötüdür (8,11).

Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom : Genellikle genç hastalarda rastlanan, kolorektal kanserin %1.1 ini oluşturan nadir bir tipidir (8,11). Klasik adenokarsinoma göre tanısında daha yaygın hastalık oluşturan taşlı yüzük hücreli karsinomu olan hastalar, neoplastik hücrelerle, yaygın intramural infiltrasyon enflamatuvar bir tabloyu düşündürür. Diffüz ve dairesel barsak duvarı infiltrasyonu sonucu intestinal segmentte kalınlaşma ve katılaşma sonucu kolonik linitis plastika denilen yapı oluşur. İleri dönemde intestinal duvarda daralma, yaygın lenf nodu metastazı ve periton yüzeyine yayılım görülür (8). Metastazlar karaciğerden çok lenf nodları, peritoneal yüzey ve overlerde gelişme eğilimindedir (11,80). Mikroskopik olarak müsinin çoğu veya hepsi hücre içindedir (11). Tanı için tümör hücrelerinin %50'den fazlası intrasitoplazmik müsin içermelidir (8,41). Hücre içi müsininden dolayı nükleusun itilmesi ile (eksantrik yerleşim) taşlı yüzük yapısı oluşur (9,11,41,81,82). Taşlı yüzük hücreli karsinomun biyolojik davranışı müsinöz karsinomdan kötüdür (79,82,83). Primer taşlı yüzük hücreli

karsinom tanısı konulmadan önce mide veya meme kanserinin kolorektuma metastazı olup olmadığı araştırılmalıdır.

Bazaloid (kloakojenik) Karsinom: Çok nadirdir (8,11). Ekzofitik veya ülserle kitle yaparlar. Bazaloid tümörler paratiroid hormon veya adrenokortikotropik hormon üretebilirler (8).

Berrak Hücreli Karsinom: Spesifik bir tip değildir. Adenokarsinomun minör çeşitidir. Gilojen birikimi sitoplazmanın berrak görünmesine sebep olur (11). Böbreğin berrak hücreli adenokarsinomuna benzer. Glikojen üretirler, müsin üretimi negatiftir. CEA güçlü bir şekilde eksprese oluşu metastatik renal karsinom ayırımında önemlidir (84).

Hepatoid Adenokarsinom : Daha yaygın olan gastrik eşdeğerine benzer (11). Hepatoselüler karsinomdan ayrılamaz. Glandüler bileşende müsin üretimi vardır (84).

Medüller Adenokarsinom : Nadir görünür. Genelde kadınlarda rastlanır. Çekum ve sağ kolonda yerleşim gösterir (11). Tümör hücreleri malign hücre adaları oluşturur. Hücreler belirgin nükleoluslu, bol pembe sitoplazmalıdır (41). Nöroendokrin belirteçler negatiftir. Davranışı histolojik görünümü kadar agresif değildir (11).

Anaplastik (iğsi ve dev hücreli,sarkomatoid) Karsinom : Diğer karsinomlardan ayırt edilmelidir. Görünümü diğer organlardakine benzer. Çok agresiftir (11).

Kolorektal Karsinomda Skuamöz Diferansiasyon : Çekum neoplazilerinde daha siktir ama kalın bağırsağın diğer bölgelerinde de görülebilir. Çoğu kez skuamöz bileşen glandüler elemanlar ile beraberdir (adenoskuamöz karsinom) (11). Tümör, kronik ülseratif kolitli hastalarda yüksek risk gösterir. Skuamöz hücreli karsinomlar, Crohn hastalığı ve uzun dönemli rektal fistüllerde de gelişebilir (8).

Kolorektal Karsinomda Trofoblastik Diferansiasyon : Kolorektal adenokarsinomda lokal olarak görülebilir. Tümör hücrelerinde HCG immünohistokimyasal olarak gösterilebilir. Nadiren tümörün tamamı koryokarsinom görünümündedir (11).

Kolorektal Nöroendokrin Tümörler:

- İyi diferansiye endokrin tümör; fonksiyonel olmayıp çapı 2 cm veya daha küçüktür. Mukoza ve submukozaya sınırlı olup anjiyoinvazyon göstermez.
- Malignite potansiyeli belirsiz nöroendokrin tümör; mukozaya ve submukozaya sınırlı, çapı iki cm'den büyük, anjiyoinvazivdir.

- İyi diferansiye nöroendokrin karsinom; muskularis propriya veya daha derin invazyon yapan veya metastazı olan tümörlerdir.

- Karsinoid form en sık olarak rektumda görülür. Rektumda sıklıkla ön veya lateral duvarda bulunur. Pratikte karsinoid sendrom ile birliktelik bildirilmemiştir. Makroskopik olarak nöroendokrin tümörler yassı, hafif çökük plak veya polipoid lezyon seklindedir. Formol fiksasyondan sonra sarı renkte görünürler. Mikroskopik olarak aynı şekilli hücreler kurdela şeklinde stromayı invaze ederler. İmmünohistokimyasal olarak nöron spesifik enolaz, kromogranin, sinaptofizin ve çeşitli peptid hormonlarla boyanır. Rektal karsinoid tümörler CEA, HCG ve prostatik asit fosfataz immünreaktivitesi gösterir. Rektal karsinoid 2 cm'den küçük ve mukoza veya submukozaya sınırlı ise lokal çıkarımla çok iyi tedavi edilir (11).

2.5.9. Histolojik Grade

Adenokarsinomlar bez yapıları temel alınarak derecelendirilir (8,11,41,79,84). Histolojik derecelendirme prognostik değer olarak da kullanılır (8). Kötü diferansiye olanlarda en azından bazı bez yapıları ve müsin üretimi izlenmelidir. Karsinomlarda eğer karışık diferansiasyon yapılanması mevcutsa derecelendirme en az diferansiye bileşene göre yapılmalıdır (8,10).

İyi Diferansiye Tümörler (Grade I): Tümörün % 75'inden fazlası bez benzeri yapı içerir (8,10).

Orta Derece Diferansiye Tümörler (Grade II): Tümörde bez benzeri yapı % 25-75 oranındadır (8,10).

Kötü Diferansiye Tümörler (Grade III): Bez benzeri yapı % 25'den azdır (8,10).

Müsinöz adenokarsinomlar ve taşlı yüzük hücreli karsinomlar genellikle grade III' tür (41).

2.5.10. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Özellikler

Kolorektal karsinomların büyük çoğunluğu müsin içeriğinden dolayı histokimyasal boyamada pozitif boyanır. İmmünohistokimyasal olarak kalın barsağın adenokarsinomu MUC1 ve MUC3 eksprese eder. Kolorektal adenokarsinomlar keratin için pozitif boyanırlar. CK20 pozitif, CK7 negatiftir. Bu özellikler akciğer, over gibi organların adenokarsinomlarının ayırıcı tanısında önemlidir. Kötü diferansiye karsinomlarda anormal boyanma paterni görülebilir (11). CEA (karsinoembriyogenik antijen) immünreaktivitesi kuraldır. Serum seviyesi ile immünohistolojik reaktivite arasında iyi uyum varken evre ve diferansiasyon derecesi arasında uyum yoktur (23). Operasyon öncesi serum CEA ve CA 242 yüksekliği kötü prognozu gösterir (85).

İntestinal epitel hücrelerinin diferansiasyon ve proliferasyonunda rol oynayan CDX2, immünohistokimyasal olarak kolorektal karsinomların büyük çoğunluğunda mevcuttur (11). Tümör bağlantılı glikoprotein (TAG-72), monoklonal antikor olarak tanınır, invaziv kolorektal karsinomlarda % 100 bulunur. Ayrıca normal mukoza, hiperplastik polip ve adenomatöz poliplerde de mevcuttur (8,11). Tümör ile ilişkili antijenlerden büyük dış antijen (LEA), tümör dokusunda ve kolorektal karsinomlu vakaların serumunda bulunur. Kalın barsak karsinomları kan grubu izoantijenlerini kaybetmiştir ve HLA B ve C ekspresyonu özellikle kötü diferansiye karsinomlarda görülür. Villin hücre iskeleti proteinidir. Mikrovillüslerin fırçamsı kenarlarının aksiyal mikroflaman bantlarıyla birlikte bulunur. Kolorektal karsinomlar diferansiasyonuna bağlı olmaksızın villin eksprese eder (11). Serum villin seviyesi, klinik seyir ve kolorektal kanserin tekrarının takibinde özellikle faydalıdır. Seviye cerrahi sonrası düşer, tam iyileşme döneminde aşağı seviyede kalır. Hastalığın tekrarında, özellikle karaciğer metastazlı vakalarda önemli ölçüde serum seviyesi artar (86). Kalretinin, kolorektal karsinomların çok az miktarında eksprese olur. Mezotelyoma ile ayırıcı tanıda bu immün belirleyici akla gelmelidir (11). Kalretinin ekspresyonu ile tümör diferansiasyonu arasında bir uyum vardır. Çoğu az diferansiye kolorektal adenokarsinomda kalretinin eksprese olurken iyi diferansiye tümörlerde sınırlı pozitifdir. Ekspresyonun derecesi, bölgesel lenf nodu metastazı ve diğer organ metastazı sayısındaki artış ile orantılıdır (86). Kolorektal karsinomun büyük oranı, özellikle müsinöz ve kötü diferansiye tümörler, HCG (human koryonik gonodotropin) ile pozitif boyanır (11). PLAP (plasental alkalın fosfataz)

bütün kolorektal karsinomların % 10'unda bulunur (11). Östrojen ve progesteron reseptörleri genellikle yoktur (11).

2.5.11. Tümör Yayılması ve Metastaz

Tüm kolorektal tümörler çevre dokulara direkt olarak invazyon ile ya da lenfatikler ve kan damarları ile metastaz yaparak yayılırlar. Metastatik yayılım en sık bölgesel lenf düğümleri ve karaciğerde görülür (11,37,38). Lenf düğümünün mikrometastazı; kademeli hematoksilin eosin kesitler, immünohistokimyasal olarak sitokeratin ve diğer markerlerin boyanması, CK19/20 için ya da mutant K-ras geni için PCR tekniğiyle tespit edilebilir (11,38). Karaciğer metastazı kan damarı invazyonunun yaygın bir göstergesidir (11). Diğer sık görülen metastaz bölgeleri; periton, akciğer ve overlerdir. Over metastazının insidansı, kolorektal tümörün rezeksiyonu sırasında postmenopozal kadınlarda bilateral ooforektomi yapmayı gerektirecek kadar yüksektir. Daha nadir metastaz bölgeleri santral sinir sistemi, kemik, testis, uterus ve oral kavitedir (11,37,38,39). Kolonik adenokarsinomlar yavaş büyüyen tümörlerdir. Karsinomun 6 cm'ye ulaşması için tahmini süre 6- 8 yıldır. İnvazyon ve metastaz birden fazla adımda gerçekleşir. Bu adımların çoğu iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Bunlardan birisi tümör içerisinde yeni kan damarlarının (anjyogenezis) oluşmasıdır. Artmış vaskülarizasyon tümör hücrelerini başka alanlara taşır. İnvazyon ve metastazda tümör hücreleri diğer hücrelere ve/veya matriks proteinlerine tutunur ki bu esnada adhezyon molekülleri kilit rol oynar. Metastatik hücreler diğer alana ulaşp da kolonize olduğunda büyüme faktörleri ile büyümeye başlar (8). Kolorektal adenokarsinomlar; perinöral, lenfatik, venöz invazyon, direk ekstansiyon ile bitişik yapılara, ekilme ile periton ve serozal membranlara, implantasyon ile cerrahi yaralara ve anastomoz alanlarına yayılırlar (8,11,43). Tümör geliştiğinde birkaç yönde büyümeye devam eder. Bu lümene, kolon duvarına doğrudur. Kasa penetrasyon, bitişik organ ve dokulara direkt yayılım ile sonuçlanır. Tümör yanlara doğru lenfatiklerle yayılabilir. Lenfatik invazyon oranı evre ve grade ile ilişkilidir. Lenfatik invazyon rektosigmoid yerleşimli olanlardan daha çok kolonun diğer alanlarına yerleşenlerde gözlenir. Kolon kanserleri sıklıkla bölgesel lenf nodlarına metastaz yapar. Düşük gradeli tümörler lenf nodlarına %30, yüksek gradeli tümörler ise %81 oranında metastaz yapar (8). Venöz invazyon üç histolojik özellik taşır;

1) Tümör hücreleri ven duvarından ayrılır.

2) Tümör hücreleri ven lümenini doldurmuştur. Merkezinde rekanalizasyon olabilir.

3) Tümör lümende vasküler kalınlaşma, duvar ve etraf dokuda enflamatuvar reaksiyon ile büyür (8).

Kolorektal karsinom en sık bölgesel lenf nodlarına, karaciğere ve akciğere metastaz yapar (23). Metastaz; tümör boyutu, lokalizasyonu ve bölgesel lenf nodu tutulumu ile ilgilidir (8,11,43).

2.5.12. Kolorektal Karsinomda Evre

Kolorektal karsinom için çok sayıda evre şeması geliştirilmiştir. Bunlar genelde barsak duvarına invazyon derinliği ve lenf nodu tutulumu olup olmamasına bağlıdır (8,11). Evrelemede 3 farklı sistem kullanılır;

1-Dukes sistemi

2-Astler-Coller sistemi

3-TNM sistemi

1932’ de Dukes, rektal karsinomların evrelemesinde yeni bir sistem oluşturulmuştur ve bu kolon karsinomlarına da uygulanmıştır. Prognozla direkt ilişkisi olduğundan dolayı bu evreleme sistemi günümüzde pek çok kişi tarafından kullanılmaktadır. Bu sistemde sınıflama tümörün derinliği ve lenf bezi tutulumuna göre A,B,C olarak yapılmıştır (Tablo 2.1). 1936 yılında Dukes, kendi sınıflamasını modifiye ederek C evresini C1 ve C2 şeklinde ayırmıştır (Tablo 2.2).

Dukes sınıflaması kolay ve anlaşılır olması nedeniyle önemini korumaktadır. 1954 yılında Astler ve Coller tarafından başka bir evreleme sistemi geliştirilmiştir. Temelde Dukes sistemine benzemekle birlikte, derinlikleri daha ayrıntılı fakat prognozla Dukes kadar ilişkili olmayan başka bir evreleme sistemi olan TNM; Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) ve Uluslararası Kanser Birliği(UICC)’nin tümör, lenf bezi ve metastaz komponentlerini gruplandırmasıyla ortaya konmuştur (Tablo 2.3) (21,87).

Tablo 2.1. 1932 Dukes Evrelemesi (21,87)

EVRE A	Tümör kolon duvarında sınırlı, Muskularis propriayı aşmamış
EVRE B	Tümör tüm kolon duvarını tutup muskularis propriayı aşmış, kolonda serozayı, rektumda perirektal dokuyu invaze etmiştir. Lenf bezi tutulumu yok.
EVRE C	Tümör lenf bezi metastazı göstermektedir.

Tablo 2.2. 1936 Dukes Evrelemesi

EVRE A	Tümör kolon duvarında sınırlı, Muskularis propriayı aşmamış
EVRE B	Tümör tüm kolon duvarını tutup muskularis propriayı aşmış, kolonda serozayı, rektumda perirektal dokuyu invaze etmiştir. Lenf bezi tutulumu yok.
EVRE C1	Bölgesel lenf bezlerinde metastaz yok
EVRE C2	Mezenterik kan damarları etrafındaki lenf bezlerinde metastaz mevcut

Tablo 2.3. Astler-Coller Evrelemesi (21,87)

EVRE A	Tümör mukozada sınırlı
EVRE B1	Tümör submukozaya sınırlı, lenf bezi invazyonu yok
EVRE B2	Tümör kas tabakasına sınırlı, lenf bezi invazyonu yok
EVRE C1	Tümör barsak duvarını aşmadığı halde lenf bezi metastazı mevcut
EVRE C2	Tümör barsak duvarını aşmış ve lenf bezi metastazı mevcut

Tablo 2.4. TNM Sınıflaması (21,87)

EVRE 0	Tis	N0	M0
EVRE I	T1,T2	N0	M0
EVRE II	T3,T4	N0	M0
EVRE III	Herhangi bir T	N1	M0
	Herhangi bir T	N2	M0
EVRE IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

• T= Primer tümör

TX: Primer tümörü bilinmeyen

T0: Primer tümör yok

Tis: Karsinoma insitu

T1: Tümör submukozaya invaze

T2: Tümör muskularis propriaya invaze

T3: Tümör subseroza ya da nonperitonealize perikolik/perirektal dokuya invaze

T4: Tümör komşu organ ya da yapılara invazyon göstermekte ve/veya visseral peritonu perfore etmektedir.

• N= Bölgesel lenf bezleri

NX: Bölgesel lenf bezleri değerlendirilememekte

N0: Lenf bezi metastazı yok

N1: 1-3 lenf bezi tutulumu mevcut

N2: 4 veya daha fazla lenf bezi tutulumu mevcut

• M= Uzak metastaz

MX: Uzak metastaz değerlendirilememekte

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz mevcut

Tablo 2.5. Farklı Evreleme Sistemlerine Göre Kolorektal Karsinomlarda Evreleme Kriterleri (21,87)

	Dukes	Astler-Coller	TNM
Mukozaya sınırlı tümör invazyonu	A	A	Tis, N0
Submukozaya sınırlı tümör invazyonu, lenf bezi tutulumu yok	A	B1	T1, N0
Submukozaya sınırlı tümör invazyonu, lenf bezi tutulumu mevcut	C	C1	T1, N1-3
Kas tabakasına sınırlı tümör invazyonu, lenf bezi tutulumu yok	A	B2	T2, N0
Kas tabakasına sınırlı tümör invazyonu, lenf bezi tutulumu mevcut	C	C1	T2, N1-3
Kas tabakasının tamamı boyunca tümör tutulumu, lenf bezi tutulumu yok	B	B2	T3-N0
Kas tabakasının tamamı boyunca tümör tutulumu, lenf bezi tutulumu mevcut	C	C2	T3, N1-3
Tümör komşu organları tutmuş, lenf bezi tutulumu yok	B	B2	T4,N0
Tümör komşu organları tutmuş, lenf bezi tutulumu mevcut	C	C2	T4,N1-3
Diğer faktörlere bakılmaksızın uzak metastaz varlığı	D	D	T1-4, N0-3, M1

Tablo 2.6. TNM Evre Gruplaması (21,87)

TNM evre gruplaması	TNM kriteri	Dukes	Astler-Coller	5 yıllık sağ kalım oranı (%)
Evre 0	Tis, N0, M0	A	A	100
Evre I	T1, N0, M0	A	B1	90
	T2, N0, M0	A	B1	80
Evre II	T3, N0, M0	B	B2	55
	T4, N0, M0	B	B2	45
Evre III	Herhangibir T N1-3 M0	C	C1/C2	40
Evre IV	Herhangibir T Herhangibir N M1	D	D	5

2.6. BRMS1 GENİ VE FONKSİYONU

Birleşmiş Milletlerde meme kanseri bayanlar arasında en sık rastlanan kanserler arasında yer almaktadır (88,89). Bununla birlikte her yıl bu hastalıktan kaynaklanan yaklaşık 250.000 den fazla yeni tanı ve 40.000 ölüm belirlenmiştir. Meme kanseri hastalarının ölümlerinin çoğu primer lezyondan değil, kanserin canlı hücrelere yayılmasındandır (90). Meme kanseri metastazı en az sıklık sırasıyla kemik, akciğer, karaciğer ve beyinde görülür (91,92). Meme kanseri için trastuzumab (herceptin) çoklu kemoterapi ve hedefe yönelik tedavilerin kullanılmasına rağmen beyin metastazı gibi büyük risk içeren hastalarda metastatik hastalığı azaltmak için kullanılan adjuvan tedavi (kanser hastalığında ana tedaviye yardımcı bir tedavi yöntemi) hastalığın yayılmasını ancak %20-50 arasında azaltabilir (93-96). Ayrıca gelişmiş sistematik tedaviler ve uzun yaşam beyin metastazı gibi nadir rastlanan metastazların sıklığını artırabilir (97). Bu nedenle meme kanseri nüks ve mortalite oranlarını azaltmak için bu sürece katkıda bulunan metastaz baskılayıcılar gibi bu süreci de iyi anlamak gerekir.

Çeşitli hücre hatlarında ve deney modellerinde metastatik süreci inhibe eden metastaz baskılayıcıların rolü araştırılmıştır (98,99). Bu farklı proteinler metastatik yeteneği inhibe ederken primer tümörün büyüme oranı üzerinde ya çok az etkiye sahiptir ya da

hiç etkili değildir. İn vitro, meme kanseri hücre migrasyonu azaltmada yüksek düzeyde BRMS1 ekspresyonu gözlenmiştir fakat standart assay veya invazyonda hiçbir etkisi görülmemiştir (100).

BRMS1 (breast cancer metastasis suppressor 1) insanda BRMS1 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Bu gen insan meme kanserinde ve melanom hücre hatlarında primer tümör oluşumunu etkilemez fakat metastatik potansiyeli azaltır. Bu gen tarafından kodlanan protein öncelikle çekirdekte lokalize ve HDAC (histondeasetilaz kompleksi) ile mSin3 ailesinin bir bileşenidir. Bu protein iki sarmal coil motifi ve birkaç bozuk/eksik lösin fermuar motifi içerir. Alternatif splayising sonucunda farklı izoformları şifreleyen iki transkript varyantı vardır (101-105).

BRMS1 geni 11q13-q13.2 bölgesinde lokalize, 7.793 bp uzunluğunda ve 10 ekzon bölgesine sahiptir (Şekil 2.16) (106).



Şekil 2.16. BRMS1 Geninin Sitogenetik Lokasyonu (106).

BRMS1 transkripsiyon co-reseptörüdür ve çekirdek ile stoplazma arasında mekik yapabilir. BRMS1 seviyeleri ubiquitin aracılı yıkımı ile yönetilir. Nukleusta bazı transkriptlerin inhibisyonunu ve diğerlerinin up-regulasyonunu gösterir. Bunun yanı sıra bu düzenlemelerin bazıları onun stoplazmik faaliyetleri nedeniyle olabilir. (ör: NFkB deasetilasyonu). Belirli bir tümör hücresi üzerindeki BRMS1 etkisi tümör tipine ve durumuna bağlıdır. Bazı çalışmalarda BRMS1 ekspresyonu uPa (urokinaz –type plasminojen activator) ve NFkB (nuklear factor k-B activity), fosfoinositit sinyal, hücreler arası boşluk iletişimini kapsayan yeniden yapılandırmalarla bağlantılı olarak gözlenmiştir. Bu durum BRMS1 in metastatik davranış dahilinde olan bir çok genin transkripsiyonunu baskılayarak çekirdek içinde HDAC nin büyük bir kısmını oluşturabileceğini göstermiştir (107-111). Phadke'nin son çalışması pro ve anti-apoptotik proteinlerin regülasyonunun BRMS1 ekspresyonundan etkilenmiş olabileceğini göstermiştir. BRMS1 ekspresyonun klinik kaybı österojen veya

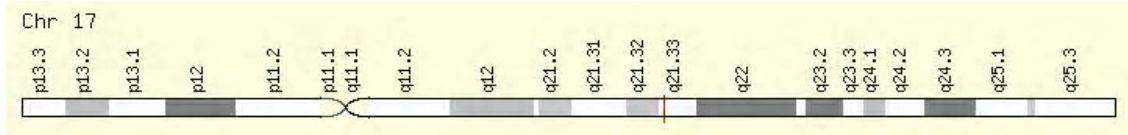
progesteron reseptörlerinin kaybı ile ilişkilendirilmiş veya HER2 reseptörünün kazanımı veya prognozu olumsuz etkilediği bilinen tüm faktörler buna sebep olarak gösterilmiştir. Ancak BRMS1 ekspresyonun hangi biyolojik basamakta metastazı inhibe ettiği rapor edilememiş ve yeni anti-metastatik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi amacıyla, metastatik süreç müdahale edilebilmede, metastaz supresor proteinlerin doğal yeteneklerinden yararlanmak için bu bilginin önemli olacağı belirtilmiştir (112).

2.7. SPOP GENİ ve FONKSİYONU

SPOP geni 17q21.3 bölgesinde lokalizedir, 79,351 baz çifti uzunluğundadır ve 14 ekzona sahiptir. (Şekil 2.17) (113) Ubikitinasyon sürecinin değişiminin kanser patogenezisinde yer aldığına dair güçlü işaretler vardır. Cul3 temelli ubikitinasyon süreci için SPOP bir adaptördür. Son yapılan çalışmalarda SPOP un bir tümör suppressör gen olabileceği ve SPOP un somatik mutasyonunun prostat kanserinde görüldüğü belirtilmiştir (114). Yapılan bir çalışmada 112 prostat tümörünün ekzonları ve normal doku parçaları sekanslanmıştır. Tekrarlanan yeni mutasyonlar MED12 ve FOXA1 dahil olmak üzere birden çok gende en sık rastlanan mutant gen SPOP olmuştur. Mutant SPOP lu prostat kanserleri ETS aile geni yeniden düzenlenmesinden yoksundur ve bu da genomik değişimlerde benzersiz bir model göstermiştir. Böylelikle SPOP mutasyonları prostat kanserlerinde yeni bir moleküler alt tipi tanımlamaktadır. En sık rastlanan mutasyona uğramış gen olan, cul3 bazlı E3 ubiquitin ligazın substrat bağlayıcı alt birimini şifreleyen SPOP geninin (tümörlerin %13'ünde) izole mutasyonları prostat kanserinde rapor edilmiş olsa da bu gen daha önce herhangi bir malignanside önemli düzeyde mutasyona uğramış olarak bulunmamıştır (115-118). SPOP mutasyonları prostat kanserinin genomik çalışmalarında esas olarak rapor edilse de yaygınlığı ve fonksiyonel uygunluğu hala bilinmemektedir (115,118).

Cul3 ubiquitin E3 ligazın bir bileşenidir. Ubiquitin E3 ligazlar mitotik bölünmede önemli rol oynarlar (5,119). Cul3 bazlı ubikitinasyon için adaptör görevi gören SPOP proteini, substratları sürece katmak için bir N-terminal MATH domaini, Cul3 ve C-terminal çekirdek lokalizasyonlu sekanslarını bağlamak için bir de BTB domaini içerir (115,120). SPOP geninin bir tümör suppressör gen olması ihtimalinin gündeme getiren kanıtlar olsa da kanser dokularındaki SPOP un somatik mutasyon ve ekspresyonlar hakkındaki veriler henüz tam değildir (6). Daha önce yapılan çalışmalarda tanımlanan SPOP un proapoptotik ve diğer tümör suppressör fonksiyonlarını göz önüne alınca,

kanserlerdeki SPOP un down regülasyonunun normal hücelere kıyasla tümör supressör gen olarak fonksiyonlarını azaltma ihtimali akla gelir ve bu da kanser gelişimine katkı sağlayabilir (4.6).



Şekil 2.17. SPOP Geni Sitogenetik Lokalizasyonu (113)

2.8. BRMS1 VE SPOP İLİŞKİSİ

Birincil tümör oluşumunu etkilemeyen fakat metastazı baskılayan tümör suppressor gen, BRMS1'in protein düzeyindeki düzenleyici mekanizması yakın zamana kadar açıklanamamıştır. Cul3, E3 ubiquitin ligazın bir bileşeni ve BRMS1'in yeni bağlayıcı partneridir. BRMS1 ve Cul3 arasındaki etkileşime SPOP adaptör proteini aracılık eder. İlginç olarak BRMS1, Cul3-SPOP kompleksi tarafından ubiquitinlenmiş olan güçlü bir alt tabaka olarak karşımıza çıkmaktadır. SPOP ekspresyonu azaldığında BRMS1 protein seviyesi artar ve BRMS1 i baskılayan hedef genlerin ekspresyonu baskılanır. Bu sonuçlar Cul3-SPOP aracılı BRMS1 'in yeni düzenleyici mekanizmasının meme kanseri gelişiminde önemli olduğunu düşündürmektedir (121).

Ubikitinasyon bağımlı proteoliz protein devrinin büyük bir mekanizmasıdır. Ubikitin zincirinin proteinlere kovalent bağlanabilmesi için E1, E2 ve E3 olmak üzere 3 farklı sınıf enzime ihtiyaç vardır (122). Ubikitinasyon, ubiquitin ilk olarak ATP-bağımlı süreçte ubiquitinasyon aktive edici enzim (E1) tarafından aktive edilmesi yoluyla çok basamaklı bir süreçtir, ardından ubiquitin taşıyıcı protein (E2)'e transfer edilir ve son olarak ubiquitin ligaz (E3) üzerinden katalizlenen reaksiyonda substrat proteinin lizine bağlı epsilon-amino grubuna transfer edilir (123).

E3 ligazlar HECT tip E3'ler ve RING-H2 tip E3'lerden oluşurlar (124). HECT tipi E3'ler kendi katalitik aktivitelerine sahiptirler fakat RING-H2 tipi E3'ler yeni aktive edilen E2'leri substrata yakınlaştıracak platformu sağlarlar. Cullin-RING ubiquitin ligazlar (CRLs), RING-H' tip E3 ubiquitin ligazların büyük bir sınıfıdır (125,126). CRLs'ler bir Cullin, bir RING-H2 finger protein ve bir substrat tanıma alt tabakasından

oluşurlar. Ökaryotlarda 7 tane Cullin keşfedilmiştir. (Cul1, Cul2, Cul3, Cul4A, Cul4B, Cul5, Cul7) (127). Cul3, RBX1 ve RBX2'ye, bir RING-H2 finger proteinine ve bir BTB domaninine (Bric-a-brac, Tramtrack, Broad-complex) bağlanır. İnsan genomunda en az 350 farklı BTB domain proteini kodlanmıştır (128).

Poliubikitinleşen proteinler 26S proteozom sistemince hedefdir. 26S proteozom, 20S proteozom core (çekirdek) partikül ve 2 tane 19S cap (regülatör) partikülü olmak üzere üç büyük alt ünit kompleksi içerir (129).

Ubikitin-proteozom sistemleri (UPS), UPS bileşenleri etkileyen ya onkoproteinlerin etkilerini arttırdığı ya da tümör süpressör miktarını veya fonksiyonunu azalttığını bulunmuş olan mutasyonlar, DNA tamiri, ekstrasellüler stresse cevap, sinyal transdüksiyonu, hücre döngüsü sürecini içeren normal hücresel fonksiyonların tamamlayıcı kısmıdır (130).

Yapılan bir çalışmada, Cul3-SPOP E3 ubikitin ligaz kompleksinin yeni bağlayıcı partneri olan BRMS1 tespit edilmiş, ayrıca, Cul3-SPOP E3 ubikitin ligaz kompleksinin BRMS1'in ubikitin bağımlı degradasyonu desteklediği kanıtlanmıştır. Meme kanser hücrelerinde Cul3-SPOP ile BRMS1 degradasyonunun biyolojik önemi doğrulanmıştır. Özetle, Cul3-SPOP aracılığıyla ubikitin bağımlı degradasyon, BRMS1'in yeni regülatör mekanizmasıdır ve bu regülasyon meme kanseri sürecinde önemlidir (121). Cul3 ve substrat ilişkisi BTB domaini içeren adaptör proteinler aracılığıyla (131,132).

BRMS1 ve Cul3 arasındaki köprüyü belirlemek için SPOP, ENC, Calicin, KCTD5 ve de BRMS1 içeren bir kaç Cul3 substrat adaptör protein araştırılmış, BRMS1'in yalnızca SPOP' a bağlı olduğu tespit edilmiş (121).

Yine aynı çalışmada SPOP'un Cul ve BRMS1 arasında adaptör olarak hareket edip etmediğini belirlemek için SPOP'un aşırı ekspresyonunun varlığı ve yokluğu durumunda Cul3 ve BRMS1 arasındaki etkileşimin derecesi karşılaştırılmıştır. BRMS1, HEK293T hücrelerinde Cul3 ile yalnız başına ya da CUL3-SPOP şeklinde eksprese olduğu ifade edilmiştir. Beklendiği gibi BRMS1, SPOP ile Cul3 üzerinden çok daha güçlü bir biçimde etkileşime girer (121).

BRMS1 proteininin proteozomal yol ile parçalandığı rapor edilmiş (133). Ancak BRMS1 regülasyonunun protein düzeyindeki detaylı mekanizması tespit edilememiştir. Bunun için bir çalışma gerçekleştirilmiş, Cul3-SPOP E3 ubikitin ligaz kompleksinin

BRMS1 protein seviyesinin düzenlediği iddia edilmiştir. BRMS1 protein stabilitesinin SPOP'dan etkilenip etkilenmediği incelenmiş, SPOP yokluğunda BRMS1 seviyesinin değişmediği gözlenmiştir. Bununla birlikte BRMS1 seviyesinde, SPOP un aşırı ekspresyonu ile zaman bağlı bir biçimde azalma gösterdiği belirtilmiştir (121).

Meme kanser hücrelerinde BRMS1 bozunmasını önleyen SPOP'un down-regülasyonu BRMS1 protein stabilitesinin Cul3-SPOP aracılığı ile alakalı olup olmadığını belirlemek için çeşitli meme kanser hücre hatlarında BRMS, SPOP ve Cul3 protein düzeyleri araştırılmıştır. BRMS1 protein düzeyinin normal meme hücre hattında (MCF10A) yüksek olduğu fakat birincil ve metastatik kanser hücre hattında çok az hatta hiç gözlenmediği belirtilmiştir. Bununla birlikte MCF10A'da (normal meme hücre hattında) Cul ve SPOP tespit edilememişken kanserli ve metastatik meme hücre hattında her iki proteinin ekspresyonu gözlenmiştir (121).

Yakın zamana kadar, BRMS1'in ekspresyon kaybı mekanizması kesin olarak açıklanamamıştır. Metastaz baskılayıcıların fonksiyonel yönünün BRMS1 protein stabilitesinin düzenlenmesinde önemli olduğu öne sürülmüştür (133). Sonuçlar gösterirki; meme kanseri sürecinde BRMS1'in ubiquitin bağımlı regülasyonunun önemi büyüktür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ

Araştırma deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI

Bu araştırma Kasım 2013 Aralık 2014 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Erciyes Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalının ortak çalışması ile gerçekleştirildi. Laboratuvar işlemleri Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

3.3. ARAŞTIRMADA KULLANILAN MATERYAL

Bu çalışmada biri kontrol olmak üzere üç grup kullanılmıştır.

3.3.1. Hasta grubu

Ocak 2005 - Ağustos 2012 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarına gönderilen kolorektal karsinom sebebiyle opere edilmiş olgular tarandı ve içlerinden seçilen 60 kolorektal kanser hastasından alınan 60 tümörlü kolorektal doku ve tümör dışı nedenlerle alınmış 20 normal kolorektal doku olmak üzere toplam 80 kolorektal doku örneği alındı. Çalışma grubu 30'ar vakalık 2 gruptan oluşmaktadır. Birinci grup *non-metastatik karsinom*, ikinci grup *metastatik karsinom* vakalarından oluşmaktadır.

Çalışma kapsamına alınan 60 adet tümörlü dokunun hepsi analizlere dahil edilerek çalışma tamamlanmıştır.

3.3.2. Kontrol Grubu

Kontrol grubuna dahil edilen doku örnekleri, tümör dışı nedenlerle alınmış 20 normal kolorektal doku olarak araştırmaya dahil edilmiş olup 20 örneğin tamamı analiz edilmiştir.

3.4. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

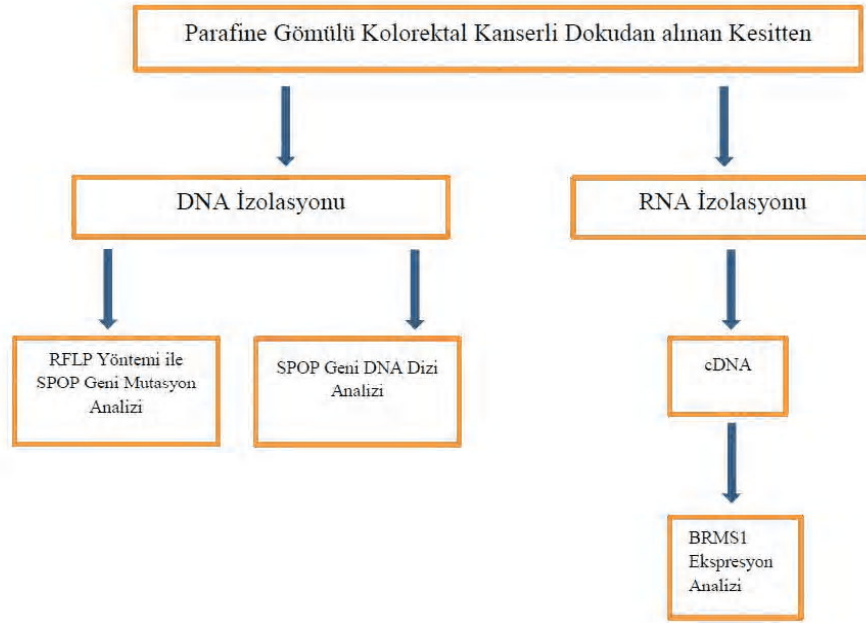
Demirbaş Malzemeler

- LightCycler 480 II (Rotkreuz, Switzerland)
- Thermal Cycler(LabCycler Sensoquest, Göttingen, Germany)
- Vorteks (IKA Vortex Genius 3)
- Santrifüj Cihazı Mikro 22 & Mikro 200R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany)
- -20 Buzdolabı (Vestel)
- +4 Buzdolabı (Profilo)
- NanoDrop 2000-Mikro-Hacim UV-Vis Spektrofotometre Cihazı (ThermoScientific, U.S.A.)
- Plate Perfect Spin (Peqlab, Erlangen, Germany)
- Isıtıcı Blok (HLC)
- Mikropipetler; 10'luk, 100'lük, 1000'lik (Nichipet Ex, HTL)
- 10'luk, 100'lük, 1000'lik pipet uçları(Greiner Bio-one, Axygen)

3.5. YÖNTEM

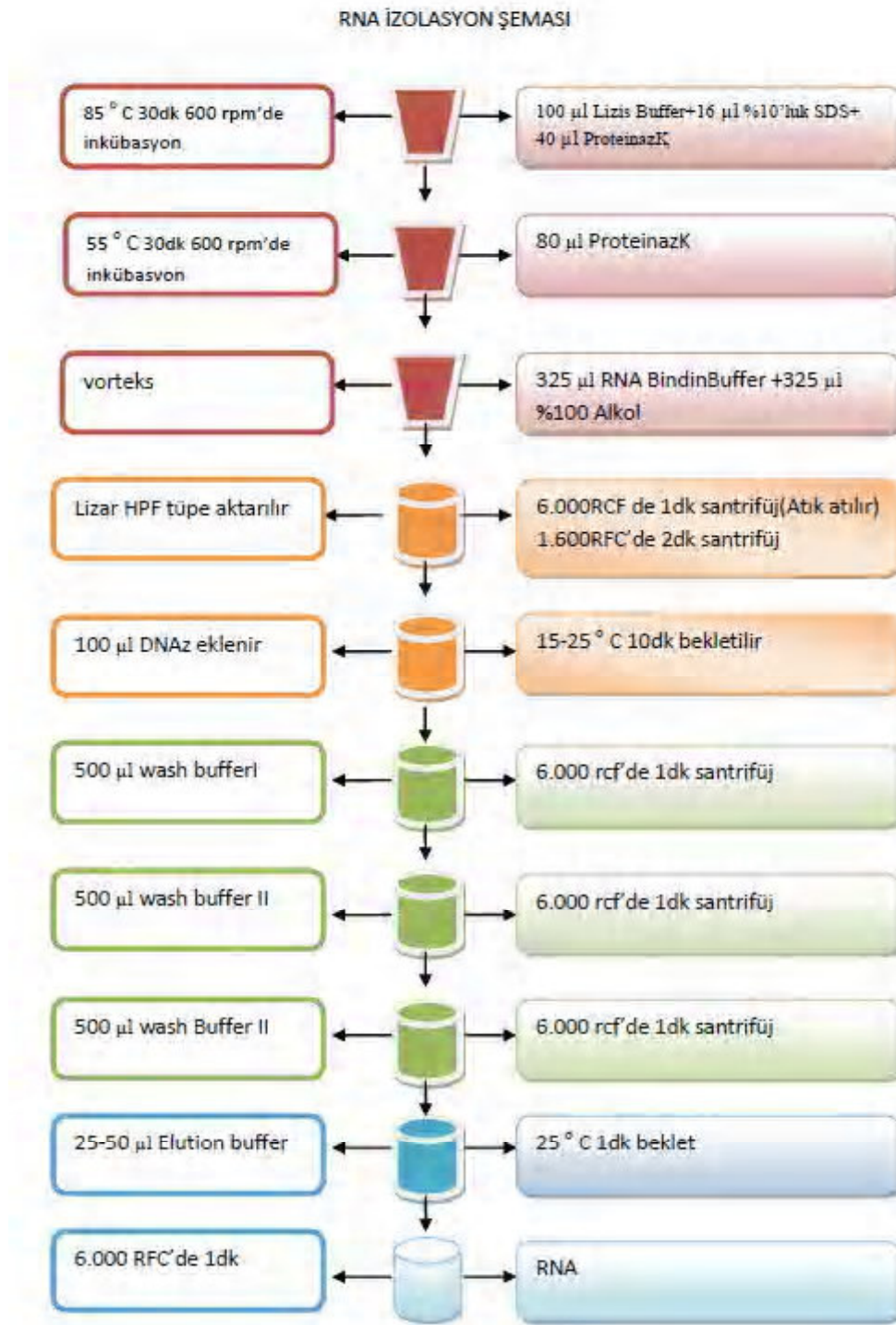
Ocak 2005- Ağustos 2012 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı laboratuvarına gönderilen kolorektal karsinom sebebiyle opere edilmiş olgular tarandı ve içlerinden seçilen 80 vakanın parafine gömülü dokularını içeren uygun bloklar çalışma kapsamına alındı.

Mikrotom cihazı blok tutucu yuvasına parafin blok kesitleri yerleştirildi. Dokunun ön yüzü bir miktar traşlanarak ana dokuya ulaşıldı. 5 mikron kalınlığında 5 kesit alınıp 2 ml'lik ependorf tüplerine yerleştirildi. Genomik DNA izolasyonları ve Total RNA izolasyonları yapıldı. İzlenen yol Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada İzlenilen Yol**3.5.1. Dokudan RNA İzolasyonu:**

1. RNA izolasyonu için Roche High Pure RNA Paraffin Kit kullanıldı.
2. Kesitlerin alındığı ependorf tüpe 800 µl xylene eklenip 5dk inkübe edildi.
3. Karışım üzerine 400 µl absöü alkol eklendi ve 10 sn vortekslendi.
4. Ependorf tüp oda sıcaklığında 16000 g 'de 2dk santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası pelet (çökelti) üstünde yüzen kısım (süpernatant) pellete dokunulmadan pipetle uzaklaştırıldı.
6. Pelet üzerine yeniden 1 ml absöü alkol eklenip 10sn vortekslendi.
7. Karışım oda sıcaklığında 16000 g'de 2 dk santrifüj edildi ve tekrar süpernatant atıldı.
8. Pelet oda ısısında (15- 25°C) 10 dk inkübasyona bırakıldı ve alkol uzaklaştırıldı.
9. Pelet üzerine 100 µl lizis buffer, 16µl SDS (%10'luk) , 40µl proteinaz-K eklendi. Tüplerin ağzı parafinlendi ve 30dk 85° C de 600 rpm de sallanarak inkübe edildi.
10. 30 dk' nın sonunda karışım oda sıcaklığında tutularak lizatın 55 ° C ye kadar soğuması sağlandı.

11. Karışım üzerine 80 µl proteinaz-K eklendi. 30 dk, 55 ° C, 600 rpm de sallayarak inkübe edildi. (Lizat şeffaf değil ise süre 10dk kadar daha uzatılır.)
12. Lizat üzerine 325 µl RNA bindig buffer ve 325 µl absolü alkol eklendi ve vortekslendi.
13. Tüm lizat dikkatli bir şekilde HPF tüplerine aktarıldı ve kapağı kapatıldı. 6000 x g (8000 rpm) de 1 dk santrifüj edildi. Ardından kolon temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne alındı. Yeniden 14000g de 1 dk santrifüj edildi. Bu aşamada Total RNA kolona tutunduğundan diğer hücre lizatları kolondan süzülerek toplama tüpünde biriktirildi ve süzüntüyü içeren toplama tüpü değiştirildi.
14. HPF tüpteki filtre üzerine 100 µl Dnaz eklenir. 15-25 ° C de 10 dk bekletildi.
15. HPF kolonu dikkatle açıp 500 µl Buffer AW1 eklendi. 6000 g de 1 dk santrifüj edildi. Her işlemde membrandan lizatın tamamen süzülmesine dikkat edildi. Her santrifüj sonrası toplama tüpü değiştirildi.
16. Kolona 500 µl buffer AW2 eklendi. 6000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve yenisi takıldı.
17. Kolona yeniden 500 µl buffer AW2 eklenir. 6000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve membranın tamamen kurummasını sağlamak için 16000 g'de 2 dk santrifüj edildi.
18. Bu işlemin ardından kolonda tutulu RNA üzerine 25-50 µl elution buffer eklendi. 15-25 ° C 1 dk bekletildi ve son kez 6000 g'de 2 dk santrifüj edildi. Kolonu bırakan RNA artık epandorf tüptedir.
19. RNA konsantrasyonları ölçülerek -20 0C' ye kaldırıldı.
20. RNA izolasyon şeması Şekil 3.1.' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1.RNA İzolasyon Şeması

3.5.2. cDNA Eldesi :

1. cDNA sentezi Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) kiti kullanılarak yapılmıştır.
2. RNA konsantrasyonları 400-600 ng/ μ l olacak şekilde her bir hasta için seyreltilecek RNA miktarları ayrı ayrı belirlendi. Belirlenen miktarlar reaksiyon tüplerine aktarıldı.
3. Kit içeriğindeki ürünler (RNase inhibitör ve Reverse transkriptaz hariç) soğuk blok üzerinde çözülmeye bırakıldı. Vortekslenip kısa santrifüj yapıldı.
4. RNase inhibitör ve Reverse transkriptaz kullanılacağı zaman soğuk blok üzerine çıkarılmasına özen gösterildi.
5. Seyreltilen RNA'lardan 5 μ l alınarak 500 μ l'lik reaksiyon tüplerine aktarıldı.
6. Tablo 3.2. deki miktarlara göre 1.karışım hazırlandı.

Tablo 3.2. cDNA Reaksiyonu İçin 1. Karışım (ÖS: Örnek sayısı)

	Bir örnek için eklenecek miktar (μ l)	Toplam
Random primer, 600 μ M	1	1 x (ÖS+1)
Oligoprimere, 500 μ M	1	1 x (ÖS+1)
dH2O	4.4	4.4 x (ÖS+1)
Toplam	6.4 μ l	6.4 x (ÖS+1)

7. Seyreltilen her bir RNA örneklerine 6.4 μ l 1. Karışımdan eklendi.
8. RNA örnekleri 65 0C'de 5 dakika denatürasyon için thermal cycler cihazına konuldu.
9. Tablo 3.3' teki miktarlara göre karışım hazırlandı.

Tablo 3.3. cDNA Reaksiyonu İçin 2.Karışım (1 örnek için), ÖS= Örnek Sayısı.

	Her bir hasta başına eklenecek miktar (µl)	Tüm hastalar için eklenecek miktar
5X Buffer (Tampon)	4	4 x (ÖS+1)
dNTP, 10 mM	2	2 x (ÖS+1)
RNase İnhibitör, 40 U/µl	0.5	0.5 x (ÖS+1)
Revers transkriptaz	1.1	1.1 x (ÖS+1)
DTT, 0.1 M	1	1 x (ÖS+1)
Toplam miktar	8.6 µl	8.6 x (ÖS+1)

10. Hazırlanan karışım thermal cycler dan alınan örneklerle 8.6 µl olacak şekilde dağıtıldı. Her bir reaksiyon tüpünde son hacim 20 µl'dir.

11. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon tüpleri Tablo 3.4. de belirtilen sıcaklık ve sürelerle göre termal cycler'da bekletildi.

Tablo 3.4. cDNA Sentezi İçin Gerekli Sıcaklık Döngüsü

Sıcaklık (° C)	Süre (Dakika)
55° C	30
85° C	5
4° C	∞

12. Elde edilen cDNA ürünleri +4° C'de muhafaza edildi.

3.5.3. Ekspresyon Analizi

- Bu çalışmanın ekspresyon analizleri Lightcycler 480 II (Roche Diagnostics Ltd. Rotkreuz, Switzerland) cihazı ile yapıldı. Analizler Lightcycler 480 Software (release 1.5.0 SP4) programı ile yapıldı.
- Her hasta iki defa çalışıldı. Her çalışmada 2 adet negatif kontrol ve kalibratör konuldu.
- Ürünler aşağıdaki protokole göre hazırlanıp cihaza yüklendi:

1. Elde edilen cDNA'lara 25 µl distile su eklenerek sulandırıldı. Sulandırılan cDNA'lardan 5 µl alınarak plate' e aktarıldı.
2. Tablo 3.5' e göre her gen için ayrı karışım hazırlandı. Housekeeping gen olarak B-actin tercih edildi.
3. Her kuyucuğa 15'er µl dağıtıldı.
4. Plate'in üzeri bant ile kapatıldı.
5. Plate perfect spin ile santrifüj yapıldıktan sonra cihaza yüklendi.
6. Lightcycler 480 Software açılarak Tablo 3.6' daki programa göre çalışma başlatıldı.

Tablo 3.5. Ekpresyon Analizi İçin Reaksiyon Karışımı (1 örnek için)

Ürün	Her bir kuyucuğa eklenecek miktar (µl)
Mastermix (LightCycler 480 Probes Master)	10
Su	4
Prob (RealTime ready Catalog Assays, Roche; RealTime ready Designer Assays, Roche) BRMS1 (Assay ID: 137070) B-actin (Assay ID: 101125)	1
Toplam Miktar	15

Tablo 3.6. Lightcycler 480 II Software Programına Ayarlanan Sıcaklık ve Süreler

	Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Sıcaklık artış/ azalış hızı (°C)	Süre (Saniye)
Preinkübasyon	1	95	4.4	600
Amplifikasyon	45	95	4.4	10
		60	2.2	30
		72	4.4	1
Soğutma	1	40	2.2	30

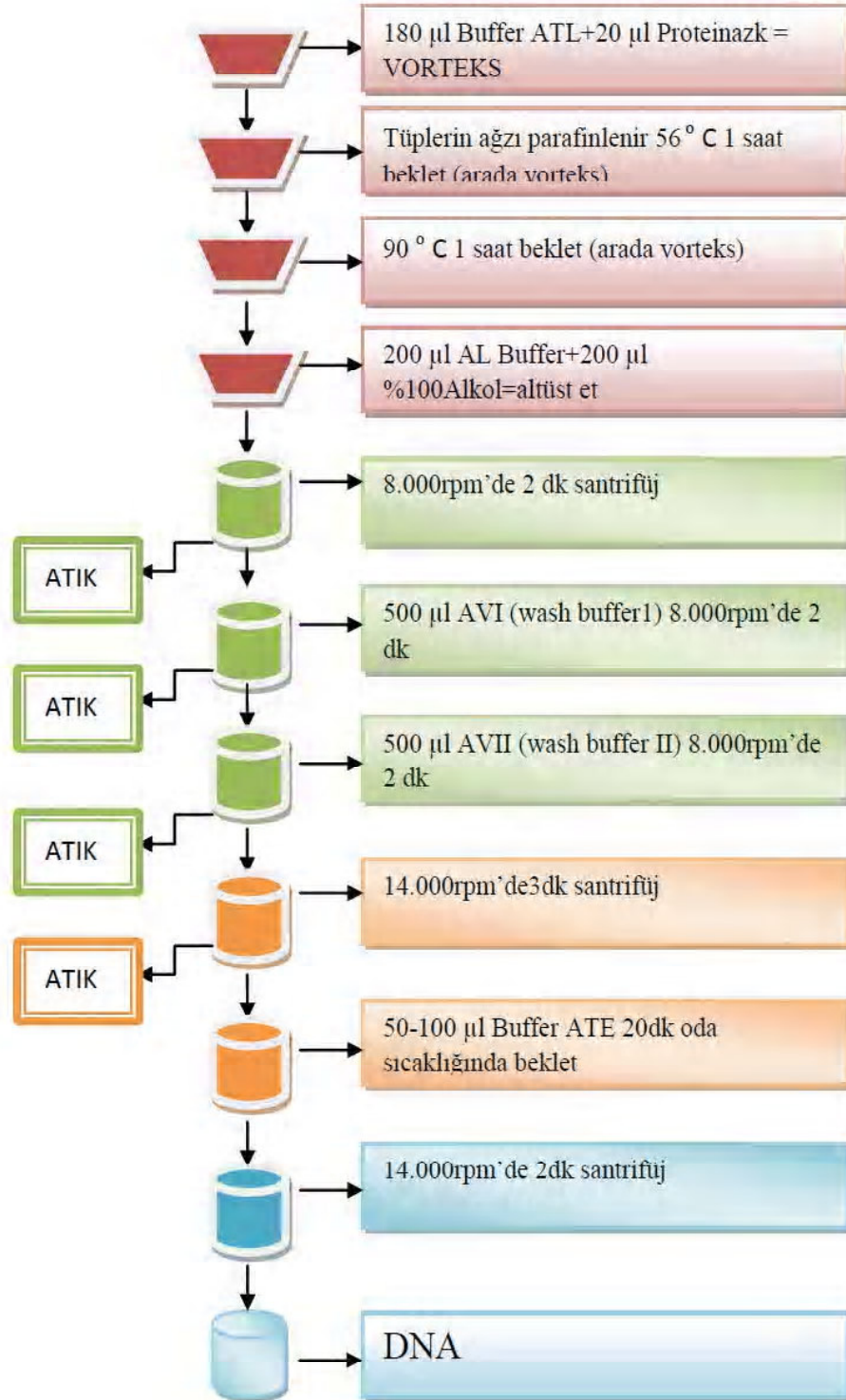
3.5.4. Dokudan DNA İzolasyonu:

Parafinli doku kesitlerinden Genomik DNA izole etmek için QIAamp DNA FFPE Tissue kiti ve bu kite ait prosedür kullanılmıştır. DNA izolasyonu kritik bir prosedür olup aşağıda kısaca özetlenmiştir.

1. DNA izolasyonu için QIAamp DNA FFPE Tissue Kit kullanıldı.
2. Kesitlerin alındığı ependorf tüpe 1 ml xylene eklendi ve 10 sn vortekslendi.
3. Ependorf tüp oda sıcaklığında 13000 rpm'de 5dk santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası pelet (çökelti) üstünde yüzen kısım (süpernatant) pelete dokunulmadan pipetle uzaklaştırıldı.
5. Pelet üzerine yeniden 1 ml xylene eklenip 10 sn vortekslendi.
6. 1 saat 37 derece her 10 dk da bir vortekslenmek üzere bekletildi.
7. Karışım oda sıcaklığında 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve tekrar süpernatant atıldı.
8. Pelet üzerine 1.5ml saf (%96-100) ethanol eklenip yeniden vortekslendi.
9. Karışım oda ısısında 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve tekrar süpernatant atıldı.
10. Pelet oda ısısında (15°-25° C) 10 dk inkübasyona bırakıldı ve etanol uzaklaştırıldı.
11. Pelet üzerine 180 µl ATL buffer, 20 µl proteinaz-K eklenip vortekslendi.
12. Tüplerin ağzı parafinlendi ve 56° C de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
13. 1 saatlik inkübasyonun ardından 90° C de 1 saat daha inkübasyona bırakıldı.
14. Karışım üzerine 200 µl AL buffer ve 200 µl saf (%96-100) ethanol eklenerek alt üst edildi.
15. Tüm lizat dikkatlice QIAamp MinElute kolon tüplerine aktarıldı ve kapağı kapatıldı. 6000 x g (8000 rpm) de 2 dk santrifüj edildi. Ardından kolon temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne alındı. Bu aşamada Genomik DNA kolona tutunduğundan diğer hücre lizatları kolondan süzülerek toplama tüpünde biriktirildi ve süzüntüyü içeren toplama tüpü değiştirildi.

16. QIAamp MinElute kolonu dikkatle açıp 500 µl Buffer AW1 eklendi. 8000 rpm de 2 dk santrifüj edildi. Her işlemde membrandan lizatın tamamen süzülmesine dikkat edildi. Her santrifüj sonrası toplama tüpü değiştirildi.
17. Kolona 500 µl buffer AW2 eklendi. 13000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildi ve mebranın tamamen kurumasını sağlamak için 14000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
18. Bu işlemin ardından kolonda tutulu DNA üzerine 50-100 µl buffer ATE eklendi.
19. QIAamp MinElute kolon tüpünün kapağı kapatılıp oda sıcaklığında 20 dk inkübasyona bırakıldı ve son kez 14000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Kolonu bırakan DNA artık epandorf tüptedir.
20. DNA izolasyon şeması şekil 3.2'de gösterilmiştir.

DNA İZOLASYONU ŞEMASI



Şekil 3.2. DNA İzolasyon Şeması

RFLP yöntemi ile SPOP mutasyonu taraması için her bir DNA izolasyonundan bir PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

3.5.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA üzerinde istenilen bölgenin, o bölgeye özgü primerler kullanılarak çoğaltılması işlemidir. Isı ile denatüre edilerek tek zincir haline getirilen DNA molekülüne, primerlerin bağlanması ve bu primerlerden yeni DNA zincirinin sentezlenmesi olarak üç aşamadan oluşur. Bu aşamalar 45 döngü halinde tekrarlanarak istenilen bölge çoğaltılmış olur.

Reaksiyonda Kullanılanlar

1. Kalıp DNA: Kullanılacak genomik DNA'nın A260/A280 oranının temizliğinin bir göstergesi olarak 1.7 - 1.9 arasında olması gerekir.

A260 → nükleik asitlerin maksimum absorbansı

A280 → proteinlerin maksimum absorbansı

A230 → fenolün maksimum absorbans verdiği dalga boyudur.

2. Düz Primer-Ters Primer: Kriterlere uygun olarak seçilen primerler genellikle 18-24 bp uzunluğunda oligonükleotitlerdir. Genellikle liyofilize halde gelen primerler steril ortamda 100 pmol/ul olacak şekilde sulandırıldıktan sonra bu stoktan 10 pmol/ul'lik bir dilüsyon hazırlanıp reaksiyonlarda kullanılabilir.

3. dNTP: Eşit konsantrasyondaki dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'nin karışımıdır.

4. MgCl₂: Taq DNA polimeraz ile beraber gelen ve enzimin çalışması için gerekli kofaktör olarak görev alan Mg iyonunu sağlar. Genellikle 25 veya 50 mM stok konsantrasyonda gelir. Reaksiyondaki son konsantrasyonu 0.8-3 mM arasında değişir.

5. 10X buffer: Taq DNA polimeraz ile beraber gelen ve enzimin çalışması için gerekli stabil pH şartlarını sağlar. Reaksiyondaki son konsantrasyonu 1X olacak şekilde kullanılır.

6. Taq DNA Polimeraz: *Thermus aquaticus* adlı termofil bir bakteriden elde edilen ve PCR reaksiyonlarında kullanılan bu DNA polimerazların hata oranı 1×10^{-4} 'dir (Tablo3.7).

Tablo 3.7. PCR İçin Örnek Reaksiyon (50 µl toplam hacim için)

10XBuffer	10X (stok konsantrasyon)	1X (son konsantrasyon)
MgCl ₂	25mM	08-3mM
PF (düz primer)	10 µM;10pmol/µl	0.2 pmol/µl
PR (ters primer)	10 µM;10pmol/µl	0.2 pmol/µl
Dntp	10 mM	200 mM
Taq polimeraz	5 U/ µl	0.3/ µl
Kalıp DNA	25-100 ng genomik DNA	0.5-2 ng/µl

PCR Basamakları:

- 1.basamak: 95 °C denaturation (ayrılma) çift iplik DNA nın tek ipliğe ayrılması
2. basamak: 50C-60 °C annealing (eşleşme) primerlerin tek iplik kalıp DNA'ya spesifik olarak bağlanması
3. basamak: 72 °C extension (sentez), primerlerle sınırlandırılmış olan bölgenin Taq polimeraz yardımıyla amplifikasyonu

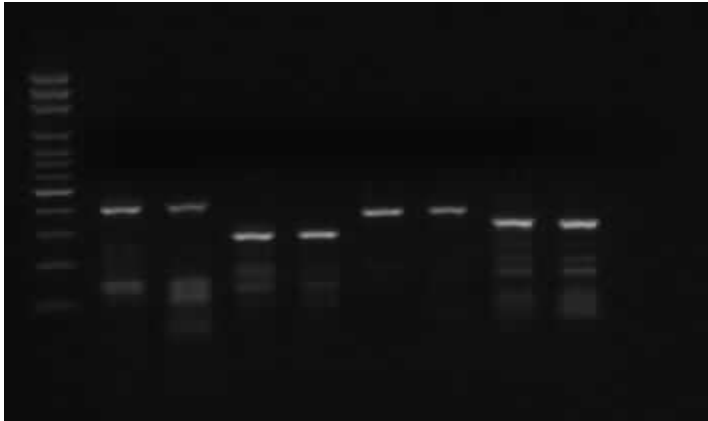
Ayrılma ve sentez aşamasındaki ısılar değişmezken eşleşme ısısı istenilen DNA dizisinin AT/GC içeriğine göre değişir. Döngüler yaklaşık olarak 30 defa tekrar edilir. Yeni sentezlenen fragmentler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Böylelikle her döngüde çoğaltılmak istenilen dizinin logaritmik (2^n , $n=30-35$ döngü) bir artışı söz konusudur. PCR ile 150-300 nükleotitlik diziler çoğaltılabilir (136)

İlgili alanı kapsayan primerler Primer 3 (134) programıyla dizayn edildi.

SPOP Geni PCR reaksiyonu için aşağıdaki primerler kullanıldı ve uygun primer seçimi için optimizasyon çalışması yapıldı (Şekil 3.3)

- 1- SPOP 115F 5'-TTTGCGAGTAAACCCCAAAG-3'
- 2- SPOP 477R 5'-GTTGGCCTCATCCAAAAGAA-3'
- 3- SPOP 200F 5'-GAAGTTCGGGCAAAATTCAA-3'
- 4- SPOP 523R 5'-GACTCACCTCGCAGAAGAGG-3'

M 1A 1B 1A 1B 1A 1B 1A 1B NK



Şekil 3.3. Primer Denemesi Agaroz Jel Görüntüsü

1A ve 1B → Primerler; 115F ve 523R kullanıldı.

1A ve 1B → Primerler; 200F ve 477R kullanıldı.

1A ve 1B → Primerler; 115F ve 477R kullanıldı.

1A ve 1B → Primerler; 200F ve 523R kullanıldı.

Deneme sonunda en uygun primerlerin 115F ve 477R olduğuna karar verildi.

PCR çalışması manuel gerçekleştirildi, primerler dışındaki diğer bütün sarf malzemeler için “Thermo” markasının ürünleri tercih edildi.

DNA hariç tüm bileşenleri içeren bir reaksiyon miks hazırlandı (Tablo.3.8)

Tablo 3.8. PCR Reaksiyon Kompozisyonu

İçerik	Miktar
10XBuffer	2.5 µl
MgCl ₂	2 µl
PF	2 µl
PR	2 µl
dNTP	1 µl
Taq	0.3 µl
dH ₂ O	10 µl
DNA	5 µl
Toplam volüm	25 µl

1. Reaksiyon miskleri hazırlandıktan sonra 20 µl PCR tüplerine dağıtıldı.
2. Her bir reaksiyon tüpüne konsantrasyonu yaklaşık 2 ng/µl 'ye ayarlanmış DNA örneklerinden 5'er µl konuldu.
3. PCR reaksiyonu Tablo 3.9' daki PCR cihaz programına göre uygulandı.

Tablo 3.9. PCR Cihaz Programı

Isı	süre	Devir sayısı
95° C	5:00	1
95° C	0:45	35
53° C	0:50	35
72° C	0:45	35
72° C	7:00	1
4° C	∞	-

4. Program tamamlandıktan sonra her bir PCR örneği DNA dizilerinin çoğalıp çoğalmadıklarını kontrol etmek amaçlı elektroforez cihazında görüntülendi.

3.5.6. Örneklerin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

Elektroforez, elektriksel bir alanda moleküllerin yüklerine, moleküler ağırlıklarına ve büyüklüklerine göre ayırt edildikleri bir tekniktir. Elektroforetik analizin temeli, moleküllerin elektriksel bir alanda jel üzerindeki göçüne dayanır.

Bu göç hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, jeldeki kullanılan maddenin konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir.

Tatlandırılmış agaroz jeller Uzak Doğu'da 17.yy 'dan beri besin olarak tüketilmektedir. Agaroz biyolojide ilk kez 1882 yılında Robert Koch tarafından *Tuberculosis* bakteri üretiminde kullanılmıştır. Agaroz jeller toz haldeki agaroz ile tampon çözeltilerin uygun miktarda karıştırılması ile hazırlanır. Agaroz jel 35-40 dakikada polimerize olarak kullanıma hazır hale gelir (136).

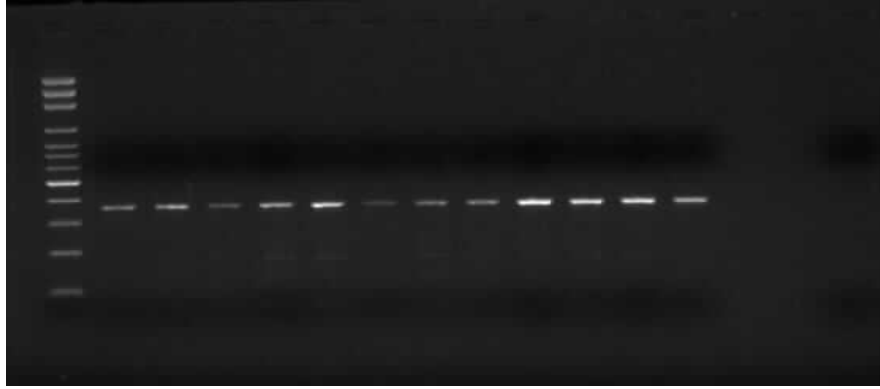
Agaroz Jel Hazırlanması ve Örneklerin Jele Yüklenmesi

1. %2'lik jel hazırlamak için 2 gr agaroz tartıldı, erlene koyuldu.
2. Erlen üzerine 100ml TBE eklendi.
3. Hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırına konuldu.
4. 5 µl EtBr eklendi ve çalkalanarak tüm çözeltiliye dağılması sağlandı.
5. Hazırlanan karışım, içinde özel tarağı bulunan kalıba dökülerek polimerize olması için en az 15 dakika beklendi.
6. Polimerizasyonu sağlanan jel tabakası üzerinden tarak kuyucukların dağılmamasına dikkat edilerek çıkartıldı ve jel elektroforez tankına yerleştirildi.
7. Islak kalması ve elektriği iletebilmesi için jel üzeri kapanacak şekilde tank üzerine TBE eklendi.
8. 0.2 ml lik tüpler içine; 6X loading buffer, bromphenolblue ve glyserol den oluşan mix den her örnek için 1'er µl konuldu.
9. Mixlerin konulduğu tüpler üzerlerine her bir örnekten 5'er µl eklendi, pipetaj yapılarak karıştırılıp jele yüklendi.
10. Bir kuyucuğa da 500bp DNA ladder konuldu.

11. 100 V da 60 dakika yürütüldü.

12. Süre tamamlandıktan sonra UV ışığı altında bantlar kontrol edildi (Şekil 3.4.)

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

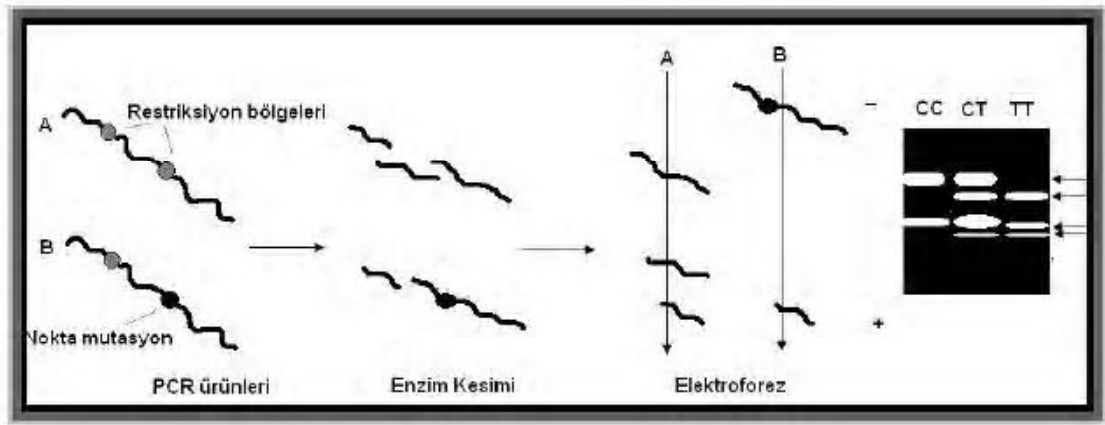


Şekil 3.4. Örnek PCR Bant Görüntüsü

3.5.7. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Yöntemi ile Mutasyon Tarama:

Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm analizi restriksiyon endonükleazların çift zincirli DNA'yı spesifik tanıma bölgelerinden kesmesi temeline dayanmaktadır. Her bir restriksiyon endonükleaz spesifik palindromik kısa DNA dizisini tanır ve keser. Mutasyon tarama amacıyla yapılan RFLP analizlerinde, incelenen mutasyon noktasını içine alan kesim noktasına sahip restriksiyon enzimleri ile kesilen PCR fragmentleri jel elektroforezi ile fragment büyüklüklerine göre ayrılırlar (135). DNA dizisinde meydana gelen substitüsyon, delesyon, insersiyon gibi değişimler var olan restriksiyon enzim kesim noktasını ortadan kaldırabilir ya da yeni bir enzim kesim noktası oluşturabilir. Böylece kesim sonucu oluşan fragment sayısını değiştirirler. Kesim sonucu oluşan bantlar agaroz jelde yürütüldüğü zaman elde edilen bant profiline bakılarak mutasyon taşıyıp taşımadığı söylenebilmektedir (136). RFLP yalnızca mutasyon analizlerinde değil bağlantı analizlerinde de kullanılmıştır. Genomda kodlama yapan ve yapmayan bölgelerde restriksiyon enzim tanıma bölgelerinin dağılımı insanlar arasında farklıdır. Bu farklılıklar doğal genomik çeşitliliği yansıtır ve genellikle fenotipik bir sonucu olmayan RFLP'leri oluşturur. Genetik hastalıkla ilişkilendirilen aday gendeki RFLP'ler, etkilenmiş bireyler ve kontroller arasındaki allel frekansları dikkate alınarak ilgili

mutasyon ve genin hastalıkla ilişkisini ortaya koymada oldukça kullanışlı bilgi vermektedir (tip.kou.edu.tr/docs/tibbi_biyoloji/laboratuvarII.doc). Mikrosatellitlere göre daha düşük olan polimorfizmleri ve TNP'lere (tekli nükleotid polimorfizmi) göre çok daha düşük olan rezolüsyonları gereği RFLP günümüzde daha çok mutasyon taramalarında tercih edilen bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. RFLP uygulaması kolay bir yöntem olmakla birlikte ayırım gücü çok yüksek değildir. Her mutasyon RE kesim noktası oluşturmayacağı veya yok etmeyeceği için tüm mutasyonların bu teknikle belirlenmesi mümkün değildir.



Şekil 3.5. Restriksiyon Kesimi ve Jel Görüntüsü (135).

Yöntem temelde 4 adımdan meydana gelir;

- 1.DNA izolasyonu
- 2.PCR
3. Elde edilen PCR ürünün restriksiyon enzimi ile kesimi (RFLP)
- 4.Elektroforez ile kesilen fragmanların ayrımının görüntülenmesi

RFLP Protokolü

Bunun için gerekli 4 ana madde vardır;

- 1.PCR ürünü
2. PCR ürününü belirli noktalardan kesen restriksiyon enzimi
3. Enzime ait 10X solüsyon
- 4.Enzim aktivitesini artırıcı BSA (bovin serum albumin)

Mutasyon Analizi:

Analiz için *Tfi* ve *DrdI* enzimleri kullanıldı.

DrdI Enzimi:



→Bu enzimin kaynağı; *Deinococcus radiodurans* (R. Morgan)

→*DrdI* enzimi için RFLP programı: 37C’de 1 saat inkübasyon.

TfiI Enzimi:



→Bu enzimin kaynağı; *Thermus filiformis* (D. Cowan, University College London).

→*TfiI* enzimi için RFLP programı: 65C’de 1 saat inkübasyon.

Mixler PCR ürünü de dahil olmak üzere standart olarak 20’ şer µl tüplere kondu ve enzimine uygun inkübasyon derecesinde cihaza kondu. 20 µl ‘lik standart mix Toblo.3.10’ daki gibidir.

Tablo 3.10. RFLP İçin Standart Mix Karışımı

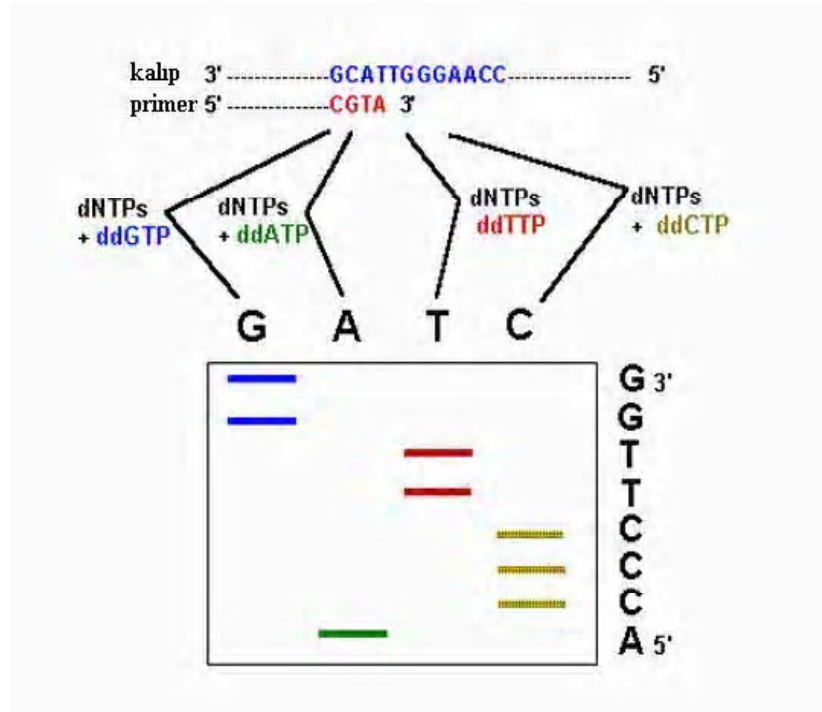
Restriksiyon Enzimi	2 µl
PCR ürünü	10 µl
BSA (10mg/ml)	2.5 µl
dH2O	3.5 µl
Toplam miktar	20 µl

Enzim kesim işlemi tamamlandıktan sonra her bir örnek ayrı ayrı elektroforez cihazında görüntülendi.

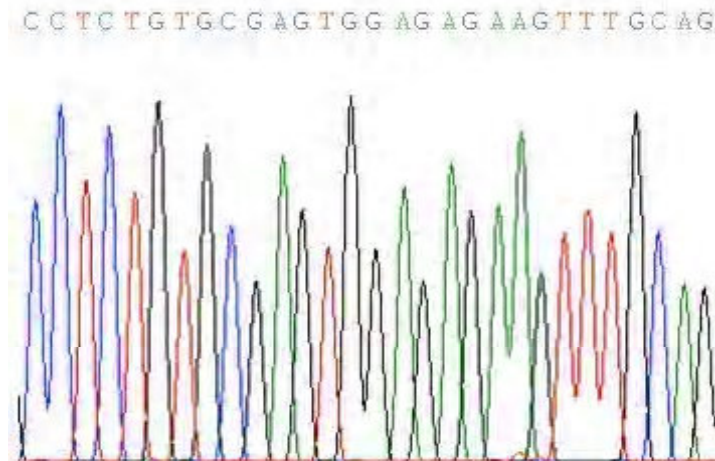
3.5.8. DNA Dizi Analizi

1970'lerde dizi analizi için geliştirilen yöntemlerden biri olan Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde, çift zincirli DNA tek zincirli hale getirilir. Dizisi saptanacak olan zincir 5'ucundan, polinükleotit kinaz enzimi kullanılarak elektroforez sonrası DNA fragmentinin tanınmasını sağlayan radyoaktif ^{32}P ile işaretlenir. Sonrasında ise dört ayrı tüpteki DNA örneğine zincirin belirli nükleotitlerden kırılmasını sağlayan kısa süreli bir kimyasal reaksiyon uygulanır. Farklı pozisyonadaki hedef nükleotitlerden kırılmış 5' ucu işaretli değişik uzunlukta moleküller elde edilir. Elektroforezde yürütülen moleküller elektriksel alanın etkisiyle en kısa olan parçacık en önde olacak şekilde hareket eder. Elektroforez sonrasında otoradyografi uygulanarak görüntülenen bantlar aşağıdan yukarıya okunur ve baz dizisi belirlenmiş olur. Fred Sanger'in geliştirdiği ve günümüzde halen kullanılmakta olan enzimatik yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan DNA sentezi gerçekleştirilmektedir. Dideoksi zincir sonlanma reaksiyonunda kalıp DNA, DNA polimeraz, deoksinükleotid trifosfat ve dideoksinükleotit trifosfatların varlığında dizi analiz reaksiyonu gerçekleşir. Reaksiyon her bir dideoksinükleotit trifosfatın zincire katıldığı noktada sonlanır. İlk nesil Sanger reaksiyonu radyoaktif işaretlemeyi kullandığı, PCR'ın dolayısıyla döngüsel sekanslamanın nimetlerinden faydalanamadığı için uzun zaman ve iş gücü gerektirmesi nedeniyle geniş ölçekli DNA dizileme çalışmalarında kullanımı mümkün olmamıştır. Otomatik DNA dizi analiz sistemlerinin ve PCR temelli döngüsel sekanslama reaksiyonunun geliştirilmesi ile sekans analizlerinin hızında ciddi bir ivme oluşmuştur. Analiz için önce farklı renkte floresan boyayla işaretlenmiş olan dört farklı dNTP (deoksinükleotid trifosfat), hedef bölgeye özgül primer ve DNA polimeraz kullanılarak reaksiyon kurulur (137). Reaksiyon ürünü lazer dedektörüne sahip bir kapiller elektroforez sisteminde yürütülerek analiz edilir. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ve bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA'nın bulunduğu jel matrisi bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir dedektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar

grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (138).



Şekil 3.6. DNA Dizi Analizi Prosesi (138).



Şekil 3.7. Dizi Analizi Sonucunda Elde Edilen Elektroferogram (139).

DNA Dizi Analizi Protokolü

Çoklu Hizalama

Clustal Omega programıyla SPOP proteininin beş farklı organizmada, *Homo sapiens* (Genbank: NP_001007227), *Mus musculus* (Genbank: NP_079563), *Canis lupus familiaris* (Genbank: XP_865004), *Macaca mulatta* (Genbank: NP_001245102), *Felis catus* (Genbank: XP_003996760) çoklu hizalaması yapılmıştır.

PCR Amplifikasyonu:

RFLP için hazırlanan PCR ürünleri kullanıldı (Tablo 3.7).

- 2 µl PCR ürünü üzerine 5 µl GML ExoSAP eklenir, vortekslenir ve daha sonra santrifüj edilir.
- Toplam 7 µl lik ürün Tablo 3.11’ deki programa göre cihaza yüklenir.

Tablo 3.11. PCR Yıkama

Aşamalar	Tanım	Sıcaklık	Süre
1	Enzim İnkübasyonu	37 °C	30 min
2	Enzim İnaktivasyonu	80 °C	15 min
3	Sonsuz Sıcaklık	4 °C	Sonsuz süre

- Çift yönlü okuma gerçekleştirildi, bunun için forward ve reverse primer kullanılarak miks hazırlandı. (Tablo 3.12)

Tablo 3.12. Sekans Reaksiyon Miksi

Bileşenler	Örnek başına konulan miktar
BigDye Terminator Mix	2.0 µl
Sekans Buffer	2.0 µl
Forward ve Reverse Primer	2.0 µl
dH2O	2.0 µl
Total	8.0 µl

- Tablo 3.13'deki programa göre Bio-Rad T100 Termal Saykıl cihazına konuldu.

Tablo 3.13. Sekans Programı

Aşamalar	Tanım	Sıcaklık	Süre
1	Aktivasyon	96°C	00:01
2	Amplifikasyon 25 Cycle	96°C	00:00:10
		50°C	00:00:05
		60°C	00:04
3	Hold	4°C	Sonsuz Sıcaklık

- Son aşama ürünün saflaştırılması aşamasıdır. Bunun için 2ml' lik filtreli tüplere 700 µl Sephadex miks (1 g Sephadex + 14 ml dH₂O) eklenir.
NOT: Sephadex kullanılmadan önce homojenizasyonu sağlamak için 30 dk vortekslenir.
- Tüpler 3 dk 2000 g' de veya 4500 rpm' de santrifüj yapılır.
- Toplama tüpü atılır, yenisi takılır.
- Kristalleşen sephadex üzerine 10 µl ürün konulur.
- 3 dk 2000 g' de veya 4500 rpm' de santrifüj edilir.
- Filter tüpler atılır, toplama tüpündeki ürün plate' e alınır ve son olarak ABI3130xl genetik analizör cihazına yerleştirilir ve analiz edilir.

3.5.9. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 17 programı ile analiz edildi. *t* testi kullanılarak gruplar arası karşılaştırmalar yapıldı. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verildi. $P < 0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. KLİNİKOPATOLOJİK BULGULAR

1.grubun (metastatik) %3.3'ü (n=1) grade I, %70' i (n=21) grade II, %26.7'si (n=8) grade III olarak değerlendirilmiştir.

2.grubun (non-metastatik) %26.7'si (n=8) grade I, %70' i (n=21) grade II, %3.3'ü (n=1) grade III olarak değerlendirilmiştir.

Grade I tümörlerin %55.5' i (n=5) erkek, %45'i (n=4) kadın, %77.8'i (n=7) >60 yaş ve %22.2' si (n=2) ≤60 yaş olduğu saptanmıştır.

Grade II tümörlerin % 76.7'si (n=46) erkek, %23.3' ü (n=14) kadın, % 86.7'si (n=52)>60 yaş, %13.3'ü (n=8) ≤ 60 yaş olduğu saptanmıştır.

Grade III tümörlerin %37.5'i (n=3) erkek, %52.5'i (n=5) kadın, %50'si (n=4) >60 yaş ve %50'si (n=4) ≤60 yaş olduğu saptanmıştır.

1.Grubun (metastatik) %3.4'ü (n= 1) Evre 2 tümör, %73.3'ü (n=22) Evre 3 tümör, %23.3'ü (n=7) Evre 4 tümör olarak saptanmıştır.

2.Grubun (non-metastatik) %20' si (n=6) Evre 1 tümör %80' i (n=24) Evre 2 tümör, olarak saptanmıştır.

Gruplar arasında grade, evre, yaş ve cinsiyet açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p>0.05).

4.2. DEMOGRAFİK BULGULAR

4.2.1. Yaş

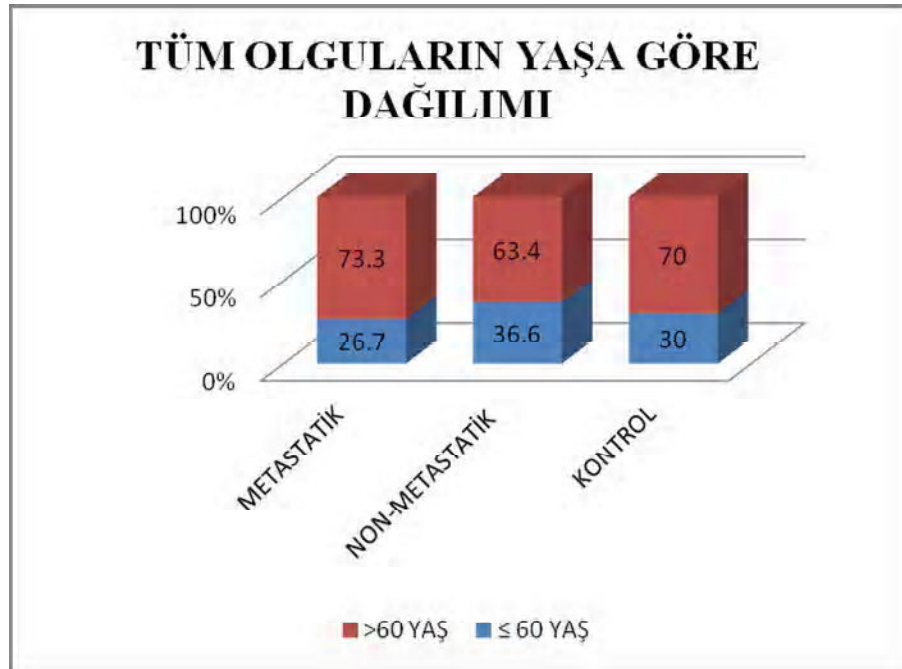
1. ve 2. Grup olguların toplam yaş dağılımı 50-94 arasında olup, ortalama yaş 66'dır. İstatistiksel değerlendirmeye olanak verebilmek için kolorektal kanserlerin görülme yaşı da göz önünde bulundurularak, olgular ≤ 60 yaş ve >60 yaş olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Buna göre olguların %31.6'sı ($n=19$) ≤ 60 yaş olup, %68.4'ü ($n=41$) >60 yaştır (Şekil 4.1).

1. Grup olguların (metastatik grup) yaş dağılımı 51-85 arasında olup, yaş ortalamaları 66,6'dır. Bunların %26.7'si ($n=8$) ≤ 60 yaş olup, %73.3'ü ($n=22$) >60 yaştır.

2. Grup olguların (non-metastatik grup) yaş dağılımı 50-87 arasında olup, yaş ortalamaları 64.3'tür. Bunların %36.6'sı ($n=11$) ≤ 60 yaş olup, %63.4'ü ($n=19$) >60 yaştır.

3. Grup olguların (kontrol grubu) yaş dağılımı 54-94 arasında olup, yaş ortalamaları 68.1'dir. Bunların %30'u ($n=6$) ≤ 60 yaş olup, %70'i ($n=14$) >60 yaştır.

Yaş açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).



Şekil 4.1. Tüm Olguların Yaşa Göre Dağılımı

4.2.2. Cinsiyet

1. ve 2. grup olguların %60'ı (n=36) erkek, %40'ı (n=24) kadındır.

1. grup olguların (metastatik grup) %60'ı (n=18) erkek, %40'ı (n=12) kadındır. (Şekil 4.2)

2. grup olguların (non-metastatik grup) %60'ı (n=18) erkek, %40'ı (n=12) kadındır. (Şekil 4.3)

3. grup olguların (kontrol grubu) %65'i (n=13) erkek, %35'i (n=7) kadındır (Şekil 4.4).

Gruplar arasında kadın-erkek dağılımı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($P>0.05$).



Şekil 4.2. Metastatik Grup Cinsiyet Dağılımı



Şekil 4.3. Non-Metastatik Grup Cinsiyet Dağılımı



Şekil 4.4. Kontrol Grubu Cinsiyet Dağılımı

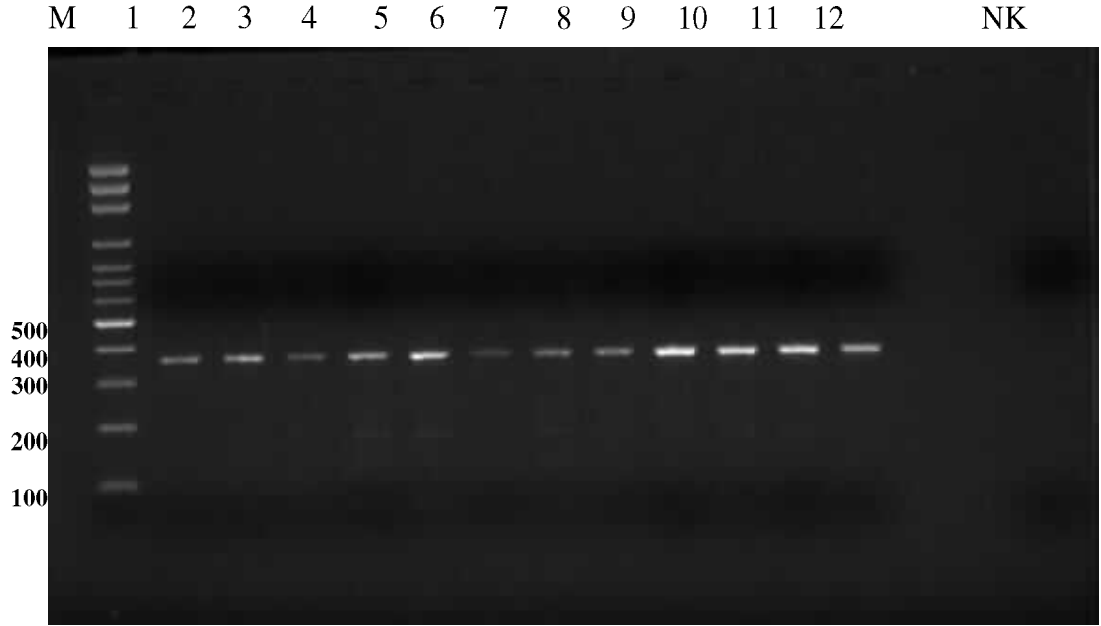
4.3. MOLEKÜLER BULGULAR

4.3.1. DNA-RNA İzolasyonu ve Spektrofotometrik Analizi

Tüm olgulardan izole edilen DNA'nın kalitesi agaroz jel elektroforezi tespit edilmiştir.

DNA ve RNA'nın miktarı ise spektrofotometrik analiz ile değerlendirilmiş ve tüm örnekler için DNA'nın mutasyon analizine, RNA'nın ise ekspresyon analizine uygun kalite miktarlarda olduğu anlaşılmıştır.

Agaroz jel elektroforezi sonucunda genomik DNA'nın intakt olduğunu anlayabilmek için jelde tek bant izlenmesi gerekmektedir. Tüm olgularda izole edilen DNA'larda 100 baz çiftlik merdiven ("ladder) moleküler marker olarak kullanılmış ve intakt DNA'nın hangi aralıkta DNA fragmanları içerdiği belirlenmiştir. Bu şekilde değerlendirilen izole edilmiş DNA'lara ait temsili agaroz jel görüntüsü Şekil 4.5 'te sunulmuştur.



Şekil 4.5. İzole edilen DNA Örneklerinin PCR ürünlerinin Temsili Agaroze Jel Görüntüsü

Nanodrop sonuçlarına göre DNA ve RNA saflıkları açısından değerlendirildiklerinde örneklerin 260/280 oranlarının istenen aralıklarda olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.1, Tablo 4.2).

Tablo 4.1. Bazı Hastaların İzole Edilen DNA'lara Ait Spektrofotometre Sonuçları

Örnek No	DNA Konsantrasyon (ng / µl)	A260	A280	260/280	260/230
1.grup-1	482.1	9.642	4.797	2.02	2.06
1.grup-2	48.1	0.961	0.499	1.93	1.27
1.grup-3	304.2	6.083	3.211	1.89	2.00
1.grup-4	786.9	15.738	8.104	1.94	2.21
1.grup-5	373.3	7.465	3.719	2.01	2.11
2.grup-1	1459.1	29.182	14.575	2.00	2.39
2.grup-2	284.1	5.682	2.803	2.03	1.90
2.grup-3	439.4	8.788	4.421	1.99	2.38
2.grup-4	633.3	12.665	6.321	2.00	2.35
2.grup-5	488.5	9.770	4.762	2.05	2.16
3.grup-1	306.9	6.139	3.199	1.92	1.88
3.grup-2	593.1	11.861	6.078	1.95	2.07
3.grup-3	773.4	15.469	7.896	1.94	2.14
3.grup-4	874.3	17.487	8.964	1.95	1.99
3.grup-5	228.3	4.566	2.271	2.01	1.52

Tablo 4.2. Bazı Hastaların İzole Edilen RNA'lara Ait Spektrofotometre Sonuçları

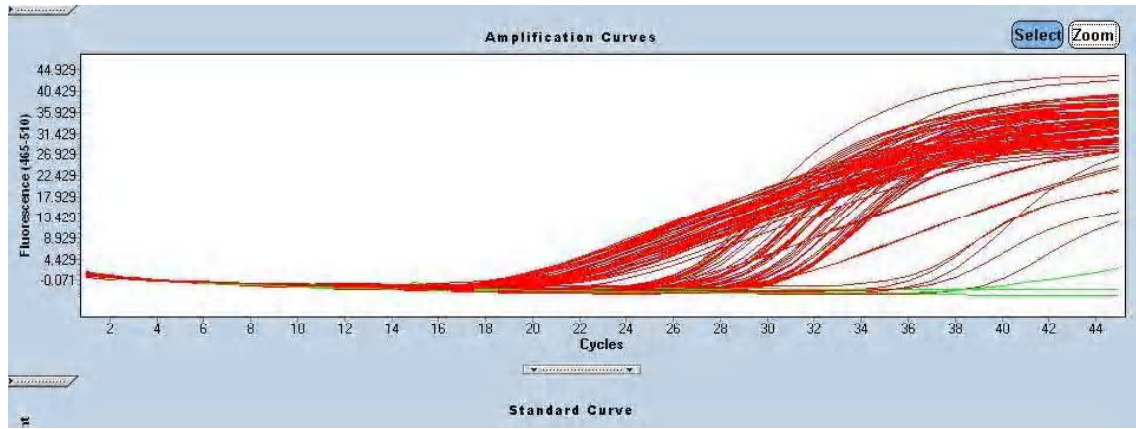
Örnek No	RNA Konsantrasyon (ng / µl)	A260	A280	260/280	260/230
1.grup-1	1054.3	26.357	12.700	2.08	2.17
1.grup-2	550.2	13.757	6.694	2.06	2.12
1.grup-3	1206.3	30.156	14.662	2.06	2.16
1.grup-4	838.0	20.950	10.307	2.03	2.11
1.grup-5	1083.3	27.082	13.110	2.07	2.19
2.grup-1	279.8	6.995	3.732	1.13	0.71
2.grup-2	402.1	10.053	5.166	1.95	2.03
2.grup-3	332.6	10.380	5.030	2.06	2.09
2.grup-4	741.4	18.535	8.911	2.08	2.21
2.grup-5	653.1	16.326	7.809	2.09	2.09
3.grup-1	1121.2	16.995	8.191	2.07	2.17
3.grup-2	861.6	21.539	10.321	2.09	2.18
3.grup-3	335.0	8.375	4.125	2.03	2.03
3.grup-4	233.6	5.839	2.827	2.07	1.87
3.grup-5	892.5	22.313	10.852	2.06	2.05

4.3.2. BRMS1 mRNA Ekspresyon Analiz Sonuçları

Bu çalışma süresince yapılan bütün deneyler, ölçümler, incelemeler ve değerlendirmelerde, kolorektal karsinom sebebiyle opere edilmiş olgular taranmış ve içlerinden seçilen 60 kolorektal kanser hastasından alınan 60 tümörlü kolorektal doku ve tümör dışı nedenlerle alınmış 20 normal kolorektal doku olmak üzere toplam 80

kolorektal doku örneği üzerinde çalışılmıştır. Çalışma grubu 30'ar vakalık 2 gruptan oluşmaktadır. Birinci grup *metastatik karsinom*, ikinci grup *non-metastatik karsinom* vakalarından oluşmaktadır. Çalışma kapsamına alınan 60 adet tümörlü dokunun ve 20 adet normal dokunun hepsi analizlere dahil edilerek çalışma tamamlanmıştır.

Çalışma RT-PCR, Lightcycler 480 II cihazında gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve hasta grubundaki her bir örnek, amplifikasyon eğrisi ve software ile (Lightcycler 480 release 1.5.0 SP4) BRMS1 mRNA ekspresyonunun var olup olmadığı ve düzeyi değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol grubunun tamamında hedef genin eksprese olduğu gözlenmiştir.



Şeki 4.6. Bazı Hastaların Ekspresyon Görüntüsü

Tüm olguların %33.3'ü ($n=20$) ≤ 60 yaş olup, BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldıklarında ortalama ekspresyon düzeyi (1.374 ± 0.635) bulunmakla birlikte, %66.7'si ($n=40$) >60 olup, BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldıklarında ortalama ekspresyon düzeyi (1.075 ± 0.720) bulunmuş, bu bulgulara dayanarak yaş ile ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.3).

Tüm olguların %40'ı ($n=24$) kadın olup BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldıklarında ortalama ekspresyon düzeyi (1.273 ± 0.699) olmakla birlikte, %60'ı ($n=36$) erkek olup BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldıklarında ortalama ekspresyon düzeyi (1.028 ± 0.708) olarak bulunmuş, bu bulgulara dayanarak cinsiyet ile BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.3).

Tüm olguların %83.7'si (n=46) grade I-II olup BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldıklarında ortalama ekspresyon düzeyi (1.146 ± 0.759) bulunmakla birlikte, %16.7'si (n=9) grade III olup BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldıklarında ortalama ekspresyon düzeyi (1.270 ± 0.698) bulunmuş, geri kalan 5 olgu grade özelliği belirtilmemesinden dolayı değerlendirme dışı bırakılmış, bu bulgulara dayanarak grade ile BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.3).

Tüm olguların %50'si (n=30) N0 (lenf nodu yok) olup, BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldıklarında ortalama ekspresyon düzeyi (1.332 ± 0.829) bulunmakla birlikte, %50'si (n=30) N+ (lenf nodu var) olup BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldıklarında ortalama ekspresyon düzeyi (1.018 ± 0.515) bulunmuş, bu bulgulara dayanarak lenf nodu ve BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyi açısından çok yüksek düzeyde olmamakla birlikte anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.1$) (Tablo 4.3).

Tüm olguların %51.7'si (n=31) Evre I-II olup, BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldıklarında ortalama ekspresyon düzeyi (1.313 ± 0.822) bulunmakla birlikte, %48.3'ü (n=29) Evre III-IV olup BRMS1 ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldıklarında ortalama ekspresyon düzeyi (1.028 ± 0.698) bulunmuş, bu bulgulara dayanarak evre ve BRMS1 ekspresyon düzeyi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p<0.05$) (Tablo 4.3).

Metastatik grup ve non-metastatik grup BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyleri açısından kendi aralarında karşılaştırılmış, olguların % 50'si (n=30) metastatik grup olup BRMS1 ortalama ekspresyon düzeyi (1.018 ± 0.515) iken, olguların %50'si (n=30) non-metastatik grup olup BRMS1 ortalama ekspresyon düzeyi (1.33 ± 0.829) olarak belirlenmiştir. Bulgulara göre metastatik ve non- metastatik gruplar arasında BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyi açısından çok yüksek düzeyde olmamakla birlikte anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.1$) (Tablo 4.3).

İstatistiksel analizde BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyi, hasta grubu ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında olguların %75'i (n=60) toplam hasta grubu olup yüksek ekspresyon gösterirken (1.175 ± 0.702), %25'i (n=20) kontrol grubu olup daha düşük ekspresyon göstermektedir (0.889 ± 0.375). Bulgulara göre hasta grubu (metastatik ve non-metastatik) BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyi ve kontrol grubu BRMS1 mRNA

ekspresyon düzeyi arasında çok yüksek düzeyde olmamakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.1$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.3. BRMS1 mRNA Ekspresyon Analizi Sonuçları

	<i>n</i>	BRMS1 ekspresyon ortalama	SS	<i>t</i>	<i>P</i> value
Yaş					
≤60	20	1.374	0.635	1.573	0.121
>60	40	1.075	0.720		
Cinsiyet					
Kadın	24	1.273	0.699	-1.334	0.187
Erkek	36	1.028	0.708		
Grade					
gradeI-II	46	1.146	0.759	-0.297	0.768
gradeIII	9	1.270	0.698		
Lenf Nodu					
N0	30	1.332	0.829	-1.760	0.084*
N+	30	1.018	0.515		
TNM Evre					
I+II	31	1.313	0.822	1.588	0.118
III+IV	29	1.028	0.698		

* $p<0.1$ anlamlı kabul edilmiştir.

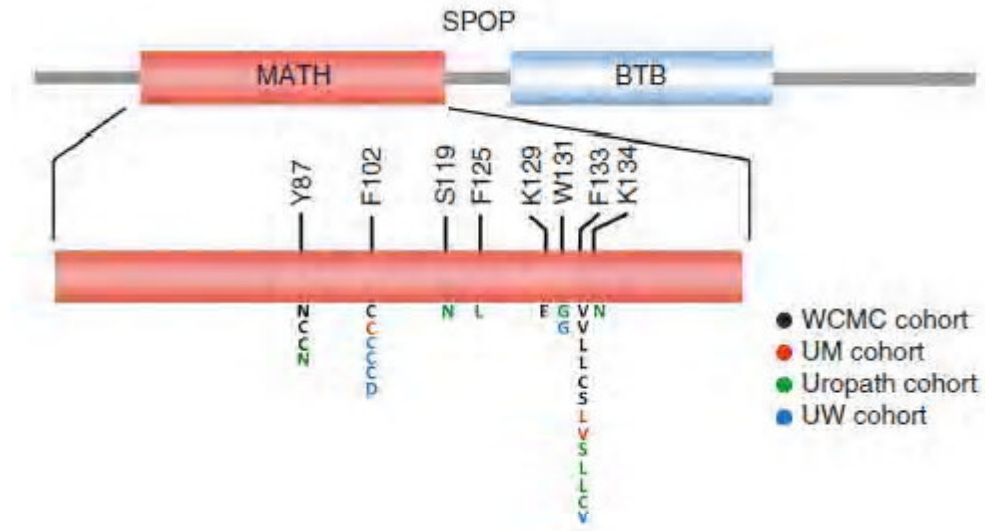
Tablo 4.4. Hasta Grubu ve Kontrol Grubu BRMS1 mRNA Ekspresyon Analizi

	<i>n</i>	BRMS1 ekspresyon ortalama	SS	<i>t</i>	<i>P</i> value
Hasta Grubu	60	1.175	0.702	1.735	0.087*
Kontrol Grubu	20	0.889	0.375		

* $p<0.01$

4.3.3. SPOP Mutasyon Analizi Sonuçları

SPOP geni 17q21.33 de lokalize, 79.351bp uzunluğunda toplamda 14 ekzona sahip bir gendir. SPOP proteini, substratları sürece katmak için bir N-terminal MATH domaini, Cul3 ve C-terminal çekirdek lokalizasyonlu sekanslarını bağlamak için bir de BTB domaini içerir (115,120,). Çeşitli topluluklarda (Weill Cornell Medical College (WCMC), University of Michigan (UM), UroPath and University of Washington (UW)) prostat kanserli hastalar üzerinde yapılan bir çalışmaya göre SPOP geni üzerindeki mutasyon bakımından hotspot bölgenin MATH domaini üzerinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7) (Tablo 4.5) (Tablo 4.6) (140).



Şekil 4.7.SPOP Geni Üzerindeki Sık Mutasyona Uğrayan Bölgeler (140).

Tablo 4.5. SPOP Geni Üzerinde Sık Mutasyona Uğrayan Bölgeler (140).

	Mutasyon tipi	Kodon Değişimi	Aminoasit Değişimi
SPOP	Missense	c.(397-399)TTC>TCC	p.F133S
	Missense	c.(373-375)TTT>TTA	p.F125L
	Missense	c.(397-399)TTC>TTG	p.F133L
	Missense	c.(355-357)AGT>AAT	p.S119N
	Missense	c.(400-402)AAG>AAC	p.K134N
	Missense	c.(397-399)TTC>TGC	p.F133C
	Missense	c.(397-399)TTC>TTA	p.F133L
	Missense	c.(259-261)TAC>AAC	p.Y87N
	Missense	c.(391-393)TGG>GGG	p.W131G
	Missense	c.(397-399)TTC>GTC	p.F133V
	Missense	c.(397-399)TTC>TTA	p.F133L
	Missense	c.(397-399)TTC>TCC	p.F133S
	Missense	c.(397-399)TTC>GTC	p.F133V
	Missense	c.(385-387)AAA>GAA	p.K129E
	Missense	c.(397-399)TTC>TTG	p.F133L
	Missense	c.(397-399)TTC>GTC	p.F133V
	Missense	c.(259-261)TAC>AAC	p.Y87N
	Missense	c.(397-399)TTC>TTA	p.F133L
	Missense	c.(259-261)TAC>TGC	p.Y87C
	Missense	c.(304-306)TTC>TGC	p.F102C
	Missense	c.(397-399)TTC>TGC	p.F133C
	Missense	c.(259-261)TAC>TGC	p.Y87C

Tablo 4.6. Çeşitli Topluluklarda Görülen SPOP Mutasyonları (140).

Topluluk	SPOP mutasyon Prevalansı	Kullanılan Teknoloji	Mutasyona uğramış noktalar
WCMC	13.3 % (11/83)	WES, RNA-seq, Sanger	Y87N, Y87C, F102C, K129E, F133V, F133S, F133L, F133C
Uropath	10.1% (9/89)	WES	Y87N,S119N,F125L, W131G, F133S,F133L, F133C, K134N
UM	6.1% (3/49)	RNA-seq	F102C, F133L, F133V
UHZ	8.3% (16/193)	Sanger	Y87N,F102C,F102S, W131C, F133V, F133L
UW	14.5% (6/39)	Sanger	F102C,F102D,W131G,F133V

T TTG CGA GTA AAC CCC AAA GGG TTA GAT GAA GAA AGC AAA GAT TAC CTG TCA CTT
 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86
 L R V N P K G L D E E S K D Y L S L

TGC
 AAC
 TAC CTG TTA CTG GTC AGC TGT CCA AAG AGT GAA GTT CGG GCA AAA TGC AAA TTC TCC
 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105
 Y L L L V S C P K S E V R A K F K F S

ATC CTG AAT GCC AAG GGA GAA GAA ACC AAA GCT ATG G
 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117
 I L N A K G E E T K A M

GTAAATGTTCTCCTCTTTTGTTCAACTCTTAAGTTTCACATCCAGAAGTTTCATACACTGACAAGTTGTGGCTTTG
 ATCTGGTTTTTGGCGTAACCTTAAATATGACTTTTTTTTTTCCCCACCCAG

TCC
 TTG
 TGC
 TTA
 GTC
 AS AGT CAA CGG GCA TAT AGG TTT GTG CAA GGC AAA GAC TGG GGA TTC AAG AAA TTC
 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136
 E S Q R A Y R F V Q G K D W G F K K F

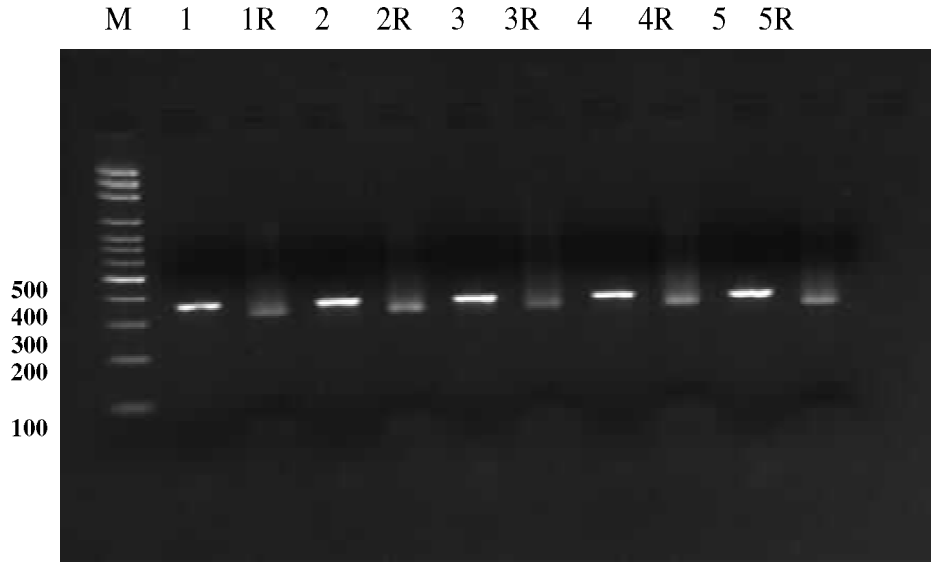
ATC CGT AGA GAT TTT CTT TTG GAT GAG GCC AAC
 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147
 I R R D F L L D E A N

Şekil 4.8. PCR Ürünü. Mavi kutucukla 6. ekzonun sınırları; *İtalik* yazıyla intron bölgesi; Yeşil kutucukla 7.ekzonun başlangıcı; 87. ve 133. amino asit pozisyonlarındaki varyasyonlar sarıyla işaretlenmiştir.

RFLP yöntemi ile F133 noktasındaki mutasyonları tespit etmek için iki enzim kullanıldı;

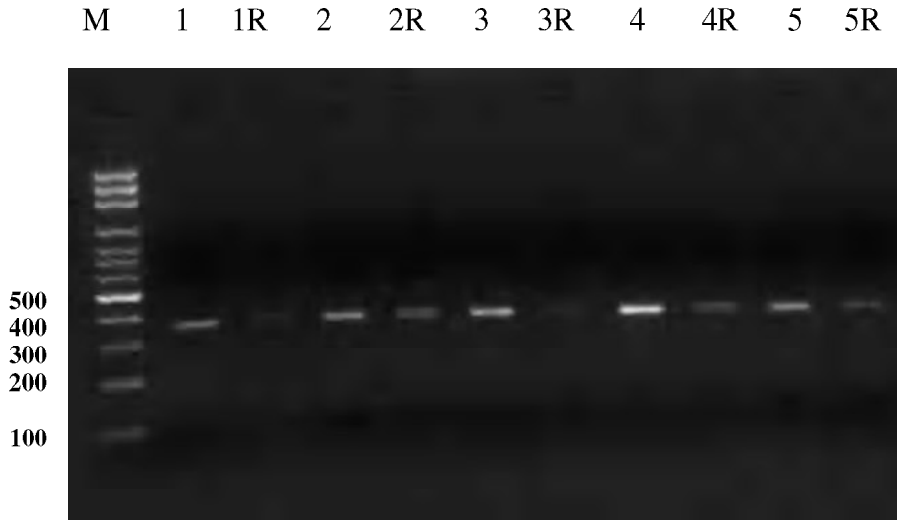
- *TfiI* restriksiyon enzimi kullanılarak GAWTC dizisindeki 'C' nukleotidinin değişip değişmediği belirlenmiştir.
- *DrdI* restriksiyon enzimi kullanılarak GACNN_NN_NGTC dizisindeki 'G' nukleotidinin mutasyona uğrayıp uğramadığı belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada *TfiI* enzimi ile kesim sonucunda bütün örneklerin normal olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9)



Şekil 4.9. Bazı Örneklerin *TfiI* Restriksiyon Enzim Kesimi Görüntüsü. M, marker DNA; 1, 2, 3, 4, 5 nolu örnekler PCR ürünleri, 1R, 2R, 3R, 4R, 5R nolu hastalar *TfiI* enzimi ile inkübe edilmiş PCR ürünlerinin bandlarıdır.

TfiI enzimi ile muamele edildikten sonra yine aynı hastaların PCR ürünleri *DrdI* enzimi ile muamele edilmiştir. Çalışma sonucunda bütün örneklerin normal olduğu saptanmıştır (Şekil 4.10).



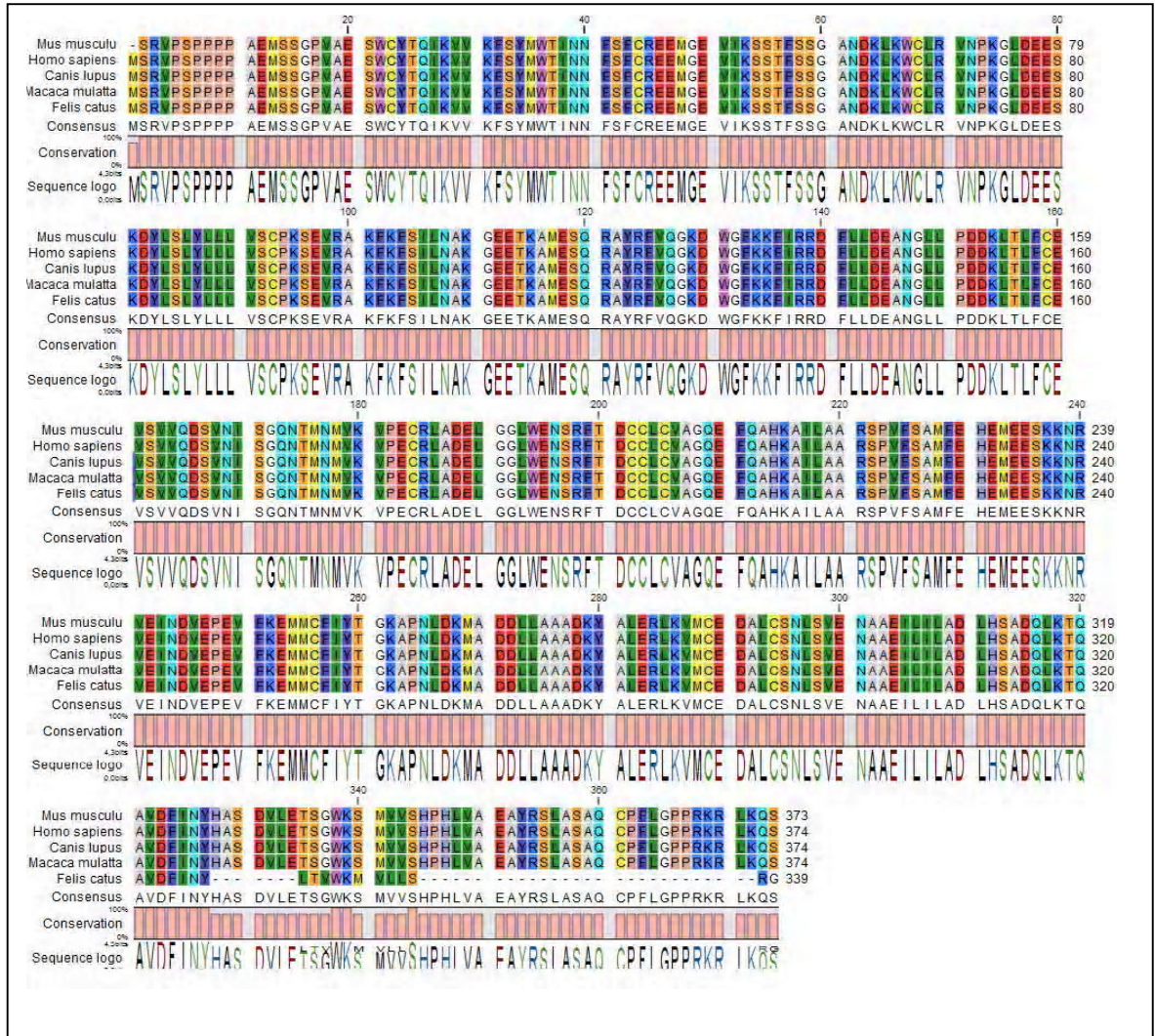
Şekil 4.10. Bazı Örneklerin *DrdI* Enzim Kesim Görüntüsü. 1, 2, 3, 4, 5 nolu örnekler PCR ürünleri, 1R, 2R, 3R, 4R, 5R nolu hastalar *DrdI* enzimi ile muamele edilen PCR ürünleri

RFLP sonucunda incelediğimiz noktada (F133) mutasyon tespit edilmemiş, bütün hastalarda bu noktanın normal olduğu belirlenmiştir.

DNA dizi analizi

Çoklu hizalama

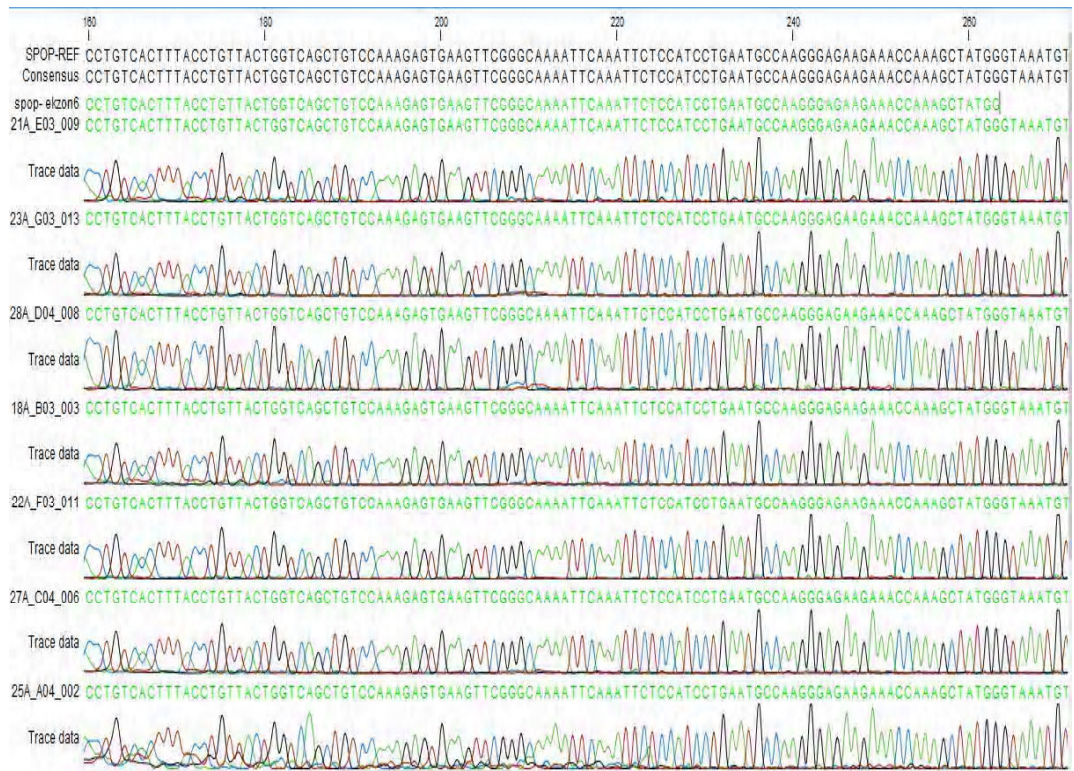
Veri tabanlarından beş farklı organizmanın SPOP proteininin aminoasit dizisi çıkartıldı. Bu diziler arasında Clustal Omega programı kullanılarak çoklu hizalama yapıldı ve SPOP proteininin organizmalar arasında da yüksek düzeyde korunup saklanmış olduğu belirlendi (Şekil 4.11).



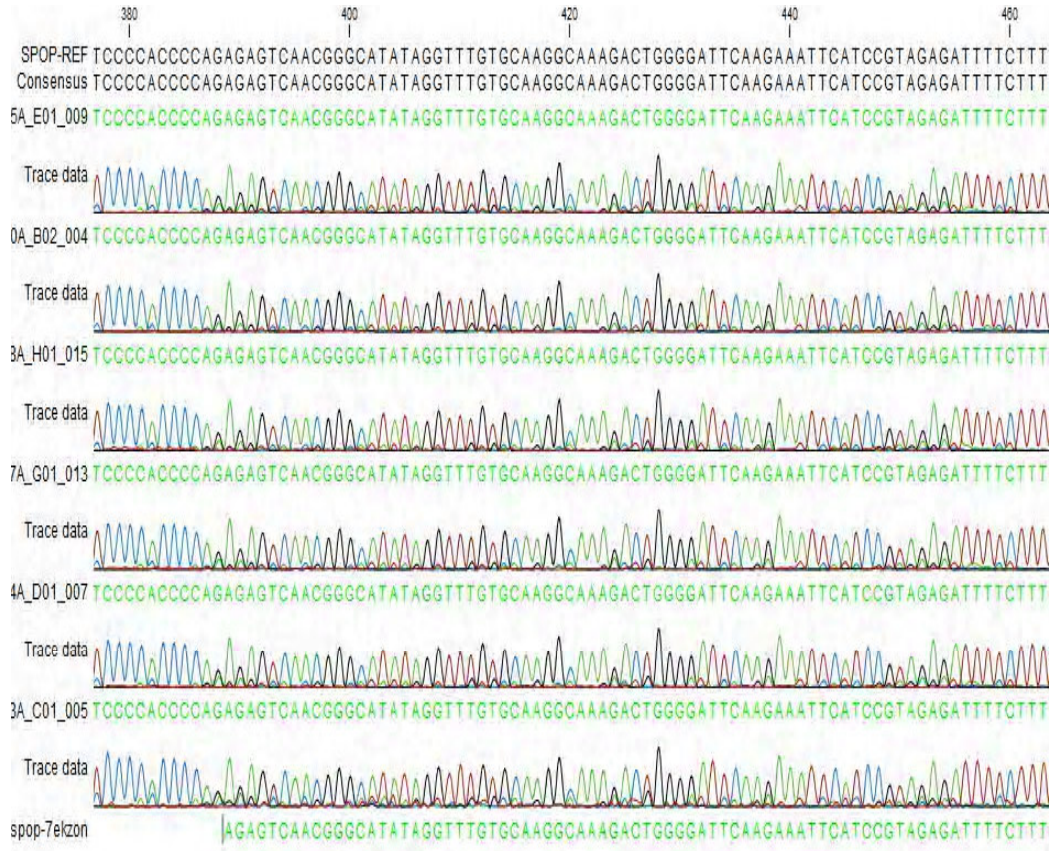
Şekil 4.11. Çoklu Hizalama

RFLP çalışmasını konformasyon amacıyla ve F133 aminoasiti dışındaki hotspot noktalarda herhangi bir mutasyon olup olmadığını belirlemek amacıyla dizi analizi gerçekleştirilmiş, sık mutasyon gözlenen sıcak noktaların hepsini içeren, 69. konumdaki aminoasitten 147. konumdaki aminoasite kadar olan bölgeyi kapsayan 6.ekzon, 6.intron ve 7. ekzonun bir kısmı dahil edilmiştir (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13).

Sonuç olarak; metastatik grup, non-metastatik grup ve kontrol grubu da dahil olmak üzere bütün hastalarda polimorfik olarak TTT/-TT intronik delesyonlara rastlanmıştır. Ayrıca metastatik gruba dahil bir hastada 6.intron bölgesinde TTT/-TC delesyonuna rastlanmıştır. Bunlar dışında dizi analizi gerçekleştirilen bu bölgede, özellikle protein kodlayan bölgelerde, mutasyon tespit edilmemiştir.



Şekil 4.12. SPOP 6.Ekzon Sekans Analizi Görüntüsü



Şekil 4.13. SPOP 7.Ekzon Dizi Analizi Görüntüsü

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kolorektal karsinomlar, akciğer kanserinden sonra kanserden ölüm nedenleri arasında 2. sırada yer alırlar. Dünyada yıllık 900.000' den fazla yeni vaka bildirilmekte ve yılda yaklaşık 500.000 kişi kolorektal karsinom nedeniyle kaybedilmektedir (11,37-39,78,141-145). Kolorektal karsinomların büyük çoğunluğunun adenom zemininden geliştiği kabul edilir (11,36-39,78).

Kolorektal karsinom batılı toplumlarda sık görülen tümörlerdendir (10,43). Afrika ve Asyada en az; Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya'da en sık oranda görülür (42). Amerika Birleşik Devletlerinde üçüncü sıklıkta tanımlanan kanserdir (7,9,10,25,146). Bir makalede kolorektal karsinomun batılı toplumlarda, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci, erkeklerde akciğer ve prostat kanserinden sonra üçüncü sıklıkta olduğu bildirilmiştir (42). İngiltere'de kansere bağlı ölümlerin ikinci en sık sebebi iken (147), Amerika Birleşik Devletlerinde kadın ve erkeklerde üçüncü en sık ölüm sebebidir (10). Kolorektal karsinomun etyolojisi, tanısı, prognozu ve tedavisine yönelik çalışmalar devam etmektedir.

Hasta bir kere tanı aldıktan sonra, tedavinin ve hastalığın seyrinin belirlenmesi önem kazanmaktadır. Kolorektal karsinomun prognozunun belirlenmesinde en önemli kriter tümörün evresidir (11,24,36-39,78,110,142,148-150). Evre arttıkça hastanın sağ kalım süresi azalmaktadır (149). Rich ve arkadaşlarının (150) makalesinde beş yıllık hayatta kalım oranı; Duke evre A'da % 77, Duke evre B'de % 44 ve Duke evre C'de % 23 olarak bildirilmiştir. Klasik tedavi yöntemi cerrahi rezeksiyondur.

İleri evre hastalıkta (Evre IV, Dukes D, uzak metastaz) kemoterapi kullanımı yaygındır. Adjuvan kemoterapi, bölgesel lenf nodu metastazı olan (Evre III, Dukes'C, lenf nodu metastazı) vakalarda da kullanılmakla birlikte lokalize hastalıkta (Evre II, Dukes'B, nonmetastatik) kullanımı tartışmalıdır. Erken evre kolon karsinomlarının %20-30'unda lokal ya da uzak nüks görülür (11,78,144,148).

Kolorektal kanser hakkındaki çalışmalar göstermiştir ki çevresel faktörler etyolojide önemli rol oynamaktadır. Düşük riskli bölgelerden kolorektal karsinomun yüksek riskli bölgelerine göç edildiğinde tek nesilde yüksek riskli toplum riski kazanılmıştır (9,147,151). Whittmore ve arkadaşları (151) yaptıkları araştırmada, günlük doymuş yağ alımının 10 gr'ı geçmesi ile fiziksel aktivitedeki yetersizliğin kolon kanser sıklığının Çinli Amerikan erkeklerde %60, Çinli Amerikan kadınlarda ise %40 arttırdığını gözlemlemişlerdir. Lifli gıda alımının kolorektal karsinom riskine etkisi konusunda yapılan araştırmada ise bilinenlerin aksine yüksek oranda lifli gıda tüketiminin kolorektal karsinomu azalttığına dair bir sonuca ulaşılmamıştır (46).

Ströhle ve arkadaşları (152), özellikle iç organ obezitesinde bu hastalık için risk olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında, ortalamadan daha fazla folik asit ve multivitamin alımının kolorektal kanser riskini düşürdüğünü görmüşlerdir.

Slattey ve arkadaşları (153) CYP1A1 genotipinin kolon veya rektal karsinom ile birlikte olmadığını; CYP1A1 ve sigara içimi birlikteliğinde kolorektal kanser riskinin arttığını belirtmişlerdir. Sitokrom P-450 (CYP), tütün ürünlerinde polisiklik aromatik hidrokarbon metabolizmasında ve aktivasyonunda rol oynamaktadır.

Yine Mizoue ve arkadaşları (154), Japon halkında sigara içiminin kolorektal karsinom riskini artırdığını görmüşlerdir. Ülseratif kolitli hastalarda kolorektal kanser için artmış risk söz konusudur (8,41,77). Bu risk hastalığın süresi ve kolitin anatomik yayılımına bağlıdır. Literatürde hastalıktan 10 yıl sonra kanser riskinin her yıl % 0.5-1 oranında arttığı bildirilmektedir. ABD'de ülseratif kolit her yıl 2-7/ 100.000 kişiyi etkilemektedir (8,41).

Kadınlarda bütün yaş gruplarında sağ taraf kolorektal kanser daha fazla iken, erkeklerde sol taraf yerleşim daha fazladır (9,155). Çalışmamızda lokalizasyonu belirtilmeyen 12 vaka olduğu için, lokalizasyon değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Literatürde, kolorektal karsinom için ortalama tanı yaşı yedinci dekat olarak verilmiştir (10). 50 yaşından küçük ve 70 yaştan büyük tanı alan vakalar kötü prognoz ile beraberdir (149). Lee ve arkadaşlarının (7) yaptığı çalışmada, ortalama yaş 61, ortalama tümör çapı 4.9'dur. Çalışmamızda ise ortalama yaş 62' dir. 13 olgunun tümör çapı belirtilmediğinden dolayı tümör çapı ile ilgili değerlendirilme yapılmamıştır. Ayrıca yaş ile BRMS1 mRNA ekspresyon seviyesi arasında herhangi bir bağlantı görülmemiştir.

Kolorektal karsinomlarda prognostik faktörler 4 alt grupta toplanmıştır (78). Buna göre:

1) Çok sayıda çalışma ile klinik sonuçları kanıtlanmış prognostik faktörler: Lokal yayılım, bölgesel lenf nodu metastazı, damar ya da lenfatik invazyon, reziduel tümör varlığı, preoperatif CEA seviyeleri

2A) Pek çok çalışma ile prognoz üzerine etkisi gösterilmiş ancak üzerinde çalışmaların devam ettiği prognostik faktörler: Histolojik grade, radial cerrahi sınır

2B) Çok sayıdaki çalışmada umut verici sonuçlar alınan fakat yeterli kesin kanıt bulunamayan prognostik faktörler: Histolojik tip, tümör yayılım paterni

3) Henüz yeterli sayıda çalışma yapılmamış prognostik faktörler: DNA içeriği, diğer moleküler genetik markırlar, perinoral invazyon, mikrodamar yoğunluğu, diğer protein sekresyonları, peritumoral desmoplazi, peritumoral inflamatuvar reaksiyon, nöroendokrin diferansiasyon alanı varlığı, proliferasyon indeksi

4) Yeterince çalışma ile prognostik önemi olmadığı gösterilmiş faktörler: Tümör boyutu, büyüme paterni (8,11,149).

Birleşmiş Milletlerde meme kanseri bayanlar arasında en sık rastlanan kanserler arasında yer almaktadır(88,89). Meme kanseri hastalarının ölümlerinin çoğu primer lezyondan değil, kanserin canlı hücrelere yayılmasındandır (90). Çeşitli hücre hatlarında ve deney modellerinde metastatik süreci inhibe eden metastaz baskılayıcıların rolü araştırılmıştır (98,99). BRMS1 (breast cancer metastasis suppressor 1) insanda BRMS1 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Bu gen insan meme kanserinde ve melanom hücre hatlarında primer tümör oluşumunu etkilemez fakat metastatik potansiyeli azaltır (10,102-105).

BRMS1 genini ilk olarak 2000 yılında Seraj (100) meme kanser hücresi MDA-MB-435 de bulmuştur. İnsan kromozomunda BRMS1 geninin lokasyonu FISH kullanılarak

11q13.1-q13.2 olarak haritalanmıştır. 264 aminoasidi kodlar ve genomik yapısı 10 kb kapsayan 10 ekzon olarak düzenlenmiştir.

Bir çalışmada, DD-RT-PCR, metastazı baskılanmış varyantlar (neo11/435) ile metastatik varyantların (435), gen ekspresyonunu karşılaştırılmak için kullanılmıştır. Başlangıçta 64 cDNA fragmenti neo11/435 hibritlerinde up-regüle olarak tespit edilmiştir. Tekrarlanan RT-PCR reaksiyonlarında 18 band tekrar amplifiye olmuştur. Bunlar içinde PCR ürünü prob olarak Northern Blotta kullanılmış ve fosfor resim analiziyle ölçülmüş, neo11/435 hibrit hücre klonlarında 6 fragmentte beş katından fazla mRNA ekspresyonu tespit edilmiştir. PCR ürünlerinin hiçbirinin metastaz baskılayıcı hücrelerde mRNA' da özel olarak ifade edildiği tespit edilmemiştir. Farklı bir şekilde eksprese edilmiş cDNA ekleri sekanslanmış, bilinen genlerin ve ETS' lerin homolojisi GenBankası / Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı DDBJ/PDB kombin veritabanı ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş, bilinen insan genlerinde cDNA' ların 3 tanesi (*N*-acetylgalactosamine-6-sulphatase, adenine phosphoribosyltransferase, and hexokinase II) homolog bulunmuştur. Geriye kalan 3 DNA fragmenti daha fazla bir çalışma için yeni ve öncelikli bir hal aldığı belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmada bu yeni cDNA' ların biri olan BRMS1 fonksiyonu ve izolasyonu raporlanmıştır. 1.5 kb' lık yalnızca bir bant elde edildiğinden dolayı uç uca eklenen dokuya özel varyantlar beklenmemiştir. Bu model BRMS1 cDNA' sının tamamı prob olarak kullanılarak çoğaltılmıştır (100).

BRMS1' in, incelenen bütün normal insan dokularında çok çeşitli düzeylerde eksprese olduğu ifade edilmiştir. Maya, insan, fare, rat, tavşan ve inek dahil, çeşitli dokuların DNA seviyelerinde BRMS1 tespit edilmiştir. BRMS1 insan cDNA sekansı AF159141 erişim sayısı ile GenBank' ta sunulmuştur. Sonuç olarak 246 aminoasitten oluşan yeni protein kodlayıcı BRMS1 in-vitro transkripsiyon ve translasyon kullanılarak onaylanmıştır (100).

Yeni keşfedilen tümör supressör gen olan BRMS1 insan tümör ilerlemesinde önemli role sahiptir. Bu genin birçok dokuda tümör suppressor rolü araştırılmış fakat rektal dokuda rolü hiç araştırılmamıştır.

İnsanların yaşam ve yeme alışkanlıklarının sürekli değişimi ile insan sağlığını tehdit eden kolorektal kanser insidansı ve mortalitesi yıldan yıla yükselen bir eğilim göstermiştir. Yapılan çalışmalarla birlikte malign tümörlerin ana biyolojik

özelliklerinden tümör invazyonu ve metastazın kanser hastalarında başlıca ölüm nedenlerinden biri olduğu kanıtlanmıştır. İnvazyon ve metastaz karmaşık bir süreçtir.

Son aylarda yapılan bir çalışmada, BRMS1 mRNA ekspresyonu 80 hastada incelenmiş, metastazdaki rolü fare modelleri kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar göstermiştir ki rektal kanser hastalarında BRMS1 mRNA ekspresyonu ve klinikopatolojik parametreler arasında anlamlı bir ilişki vardır ve BRMS1' in aşırı ekspresyonunun rektal kanser ksenograftında, metastaz ve invazyonda azalmayı sağladığı gözlenmiştir (156).

Küçük hücreli akciğer kanserlerinde yapılan bir çalışmada (157), hücre kültüründen RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, RT-PCR ve micro array teknolojileri kullanılarak çalışma tamamlanmıştır. Sonuç olarak, in vivo ve in vitro model sistemler kullanılarak BRMS1' in NSCLC hücrelerinde bir metastaz baskılayıcı gen olduğu gösterilmiştir.

İnsan melanom hücrelerinde metastas baskılayıcı BRMS1' in rolü incelenmiş (158), RT-PCR ile mRNA ekspresyonuna bakılmış ve bu hücrelerde BRMS1 mRNA ekspresyonunun yüksek olduğu gözlenmiştir.

Zhang ve arkadaşlarının (159), yumurtalık kanserinde yaptıkları çalışmaya 25 normal yumurtalık, 15 benign tümörlü yumurtalık ve 15 tanesi peritonda metastaz yapmış 28 adet primer yumurtalık epidelyal karsinoma (POEC) dokusu dahil edilmiş ve BRMS1' in ekspresyon düzeyi incelenmiştir. 28 POEC' nin 11 tanesi Evre I-II, 17 tanesi Evre III-IV olduğu belirlenmiştir. Hiçbir hasta operasyon öncesi kimyasal tedavi almamıştır. RT-PCR ile BRMS1 gen ekspresyon seviyelerini belirlemek için en uygun şartlar tespit edilmiştir. Normal yumurtalık dokusu ve benign yumurtalık tümörlerinin tamamında BRMS1' in mRNA ekspresyonu yüksek seviyelerde sergilenmiştir. Buna ek olarak POEC içinde BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyleri normal yumurtalık dokuları ve benign yumurtalık tümör dokularına göre daha düşük seviyelerde tespit edilmiştir ($p<0.05$). BRMS1' in mRNA seviyeleri, lenf nodu veya uzak metastazı bulunan ileri evre (III-IV)' ye göre erken evrede (I-II) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.002$). İstatistiksel analiz BRMS1 mRNA ekspresyon düzeyinin non-metastatik tümörlerde lenf nodu veya uzak metastaza sahip olan tümörlere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur ($p=0.011$). Buna ek olarak BRMS1 mRNA ekspresyonunun uzak metastazda birincil tümöre göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$) ve uzak metastaz yapan 15 olgudan 8' inde BRMS1 mRNA ifadesi görülmemiştir. Daha

önce melanoma ve meme kanserlerindeki rolüne ek olarak yumurtalık kanserlerinde de metastaz baskılayıcı gen olarak BRMS1 fonksiyonu açığa çıkmıştır.

BRMS1 proteininin normal ekspresyonun, hücrelerin metastaz ve invazyonunu ve çeşitli hücre tümörlerini (meme kanseri, yumurtalık kanseri, mide kanseri, mesane kanseri, endometriyal kanser) engelleyebildiği belirtilmiştir (100,160).

BRMS1' in protein düzeyindeki düzenleyici mekanizması yakın zamana kadar açıklanamamıştır. BRMS1'in yeni bağlayıcı partneri olan Cul3, E3 ubiquitin ligazın bir bileşenidir. Ayrıca BRMS1 ile Cul3 arasındaki etkileşime SPOP adaptör protein aracılık etmektedir. İlginç olarak BRMS1, Cul3-SPOP kompleksi tarafından ubiquitinlenmiş güçlü bir alt tabaka olarak karşımıza çıkmaktadır. SPOP ekspresyonu azaldığında BRMS1 protein seviyesi artar ve BRMS1 baskılayan hedef genlerin ekspresyonu baskılanır. Bu sonuçlar Cul3-SPOP aracılı BRMS1' in yeni düzenleyici mekanizmasının meme kanser gelişiminde önemli olduğu düşündürmektedir (161).

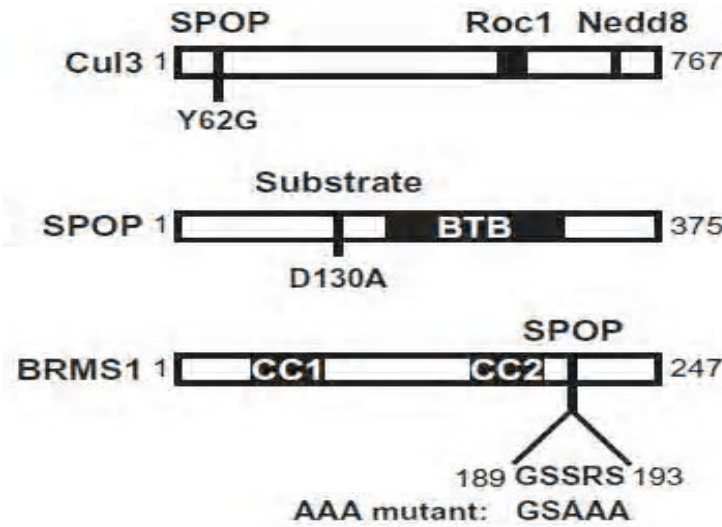
Metastas ile ilgili genlerin transkripsiyonel regülasyonu aracılığıyla BRMS1 in anti-metastatik fonksiyonunun mekanizması verilmektedir. Birçok rapor bu düşüncüyü desteklemektedir (162).

Son zamanlarda BRMS1 ile ilgili çalışmalarda meme kanser hücrelerinde çoklu metastaz ile ilişkili microRNA'ların (miR10b, -373, -520c, -146a, -146b ve -335) ekspresyonu gösterilmiştir (162). miR-146a ve miR146b' nin BRMS1 mRNA ekspresyonunu artırdığını ve bu miRNA' ların EGFR ekspresyonunun azalması ile metastazı baskıladığı gözlemlenmiştir (163).

BRMS1' in, Cul3 ve SPOP' un etkileşimi ile ilgili, yeni regülatör mekanizmasını aydınlatmak için HEK 293T hücrelerinin 3Xflog etiketli BRMS1 saflaştırılarak bir çalışma yapılmış ve bu çalışmayla BRMS1' in yeni bağlayıcı partneri olarak E3 ubiquitin ligazın bir komponenti olan Cul3 tespit edilmiştir. BRMS1 ve Cul3' ün ilişkisi immünopresipitasyon aracılığı ile doğrulanmıştır. MCF7 meme kanser hücrelerinin nükleer kısmı kullanılarak BRMS1 ve SPOP' un endojen etkileşimi tespit edilmiş ve bu görüşle birlikte Cul3 adaptörü ve substrat arasındaki etkileşim doğrudan olduğu tespit edilmiştir (161).

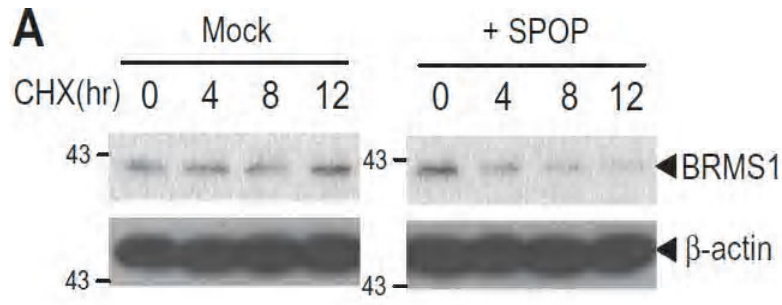
Aynı çalışmada (161), SPOP aracılı BRMS1 ve Cul3' ün etkileşimine bakılmış, SPOP' un Cul3 ve BRMS 1 arasında adaptör olarak hareket edip etmediğini belirlemek için

SPOP' un aşırı ekspresyonunun varlığı ve yokluğu durumunda Cul3 ve BRMS1 arasındaki etkileşimin derecesi karşılaştırılmış, BRMS1' in HEK293T hücrelerinde Cul3 ile yalnız başına ya da Cul3-SPOP şeklinde eksprese olduğu belirlenmiştir. Beklendiği gibi BRMS1, SPOP ile Cul3 üzerinden çok daha güçlü bir şekilde etkileşime girer. Ayrıntılı olarak Cul3 ve BRMS1' in SPOP aracılı yeni etkileşimini karakterize etmek için Şekil 5.1 'deki mutant diyagram kullanılmıştır.



Şekil 5.1. Deneyde Kullanılan Mutantların Şematik Diyagramı (161)

BRMS1 proteinin proteozomal yol ile parçalandığı rapor edilmiştir (161). Ancak BRMS1 regülasyonunun protein düzeyindeki detaylı mekanizması tespit edilememiştir. Yapılan çalışmada (161), Cul3-SPOP E3 ubiquitin ligaz kompleksinin BRMS1 protein seviyesini düzenlediği iddia edilmiş ve BRMS1 protein stabilitesinin SPOP' dan etkilenip etkilenmediğini incelenmiştir. SPOP yokluğunda BRMS1 seviyesi değişmemiştir fakat SPOP' un aşırı ekspresyonu ile zamana bağlı bir biçimde azalma gözlenmiştir (Şekil 5.2) Başka bir ihtimalle BRMS1, Cul3-SPOP E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir hedefi olabileceğini düşünen bu araştırmacılar BRMS1' in bu kompleks tarafından ubiquitinleşmiş olabileceğini incelemişler ve sonuçlar, BRMS1 ubiquitinasyonundan Cul3-SPOP E3 ubiquitin ligaz kompleksinin sorumlu olduğunu göstermiştir.



Şekil 5.2. BRMS1' in Cul3-SPOP E3 Ubiquitin Ligaz Kompleksiyle Ubikitinleşmesi
(161)

BRMS1 protein stabilitesinin Cul3-SPOP aracılığı ile alakalı olup olmadığını belirlemek için çeşitli meme kanser hücre hatlarında BRMS1, SPOP ve Cul3 protein düzeyleri araştırılmıştır. BRMS1 protein düzeyinin normal meme hücre hattında (NCF10A) yüksek olduğu ve birincil ve metastatik hücre hattında çok daha az veya hiç gözlenmediği belirlenmiştir. Bununla birlikte MCF10A' da Cul3 ve SPOP tespit edilememiştir fakat kanserli ve metastatik meme hücre hatlarında bu iki proteinin ekspresyonu gözlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar BRMS1 transkript seviyesini RT-PCR aracılığıyla meme kanser hücre hatlarında tespit etmişlerdir. Ancak BRMS1 protein ve transkript seviyeleri arasında açık bir ilişki belirlenememiştir. Bu sonuçlar göstermiştir ki; ubikitinasyon bağımlı regülasyon meme kanser hücrelerinde BRMS1 protein seviyesine bir ölçüde katkıda bulunabilir (161).

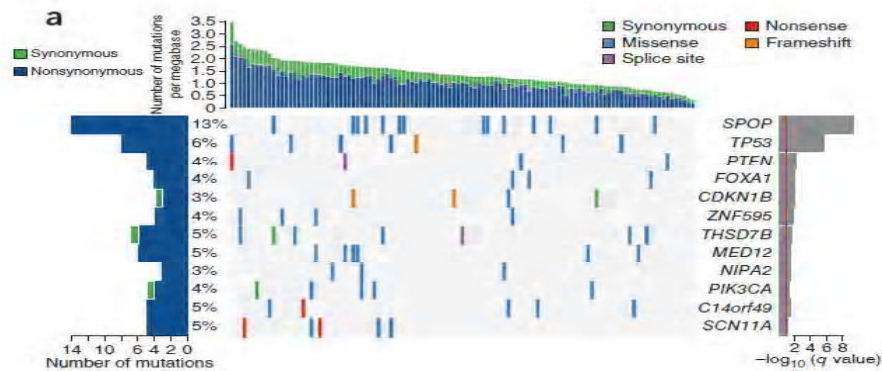
Dünya çapında erkekler arasında prostat kanseri en yaygın 2. kanser tipidir ve her yıl 250.000 üzerinde ölüme neden olmaktadır (164). Ağrısız hastalıkların aşırı tedavisi ayrıca önemli hastalık oranına neden olmaktadır (165). Tekrarlanan somatik baz çifti substitisyonlarının prostat tümörüne daha az katkıda bulunulduğuna inanılmış, fakat geniş topluluklarda sistematik analize tabi tutulmamıştır (114,166).

Başka bir çalışmada 112 prostat tümörünün ekzonlarını ve normal doku parçaları sekanslanmış, tekrarlanan yeni mutasyonlar, MED12 ve FOXA1' de dahil olmak üzere birden çok gende SPOP' un en çok rastlanan mutant gen olduğu belirlenmiştir. 112 prostat adenokarsinomasının ve eşleşmiş normal örneklerin DNA'sına sekans uygulanmış ve daha sonra ekzon capture yapılmış, derecelerine, kademelerine ve tekrarlama risklerine göre dağıtılmış Amerikalı ve Avustralyalı deneklerin prostatektomi örneklerinin tedavisine odaklanılmış her bir tümör için sinonim olmayan gen büyüklüğüne, sekans bağlamına ve mutasyon sıklığına göre beklenenden daha fazla

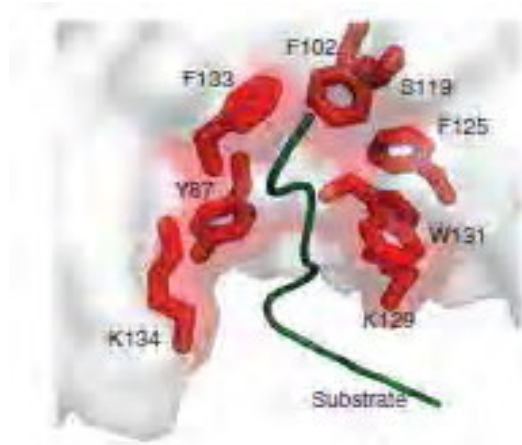
barındırılan genler araştırılmıştır. 12 gen $q < 0.1$ olan mutasyonlar için zenginleştirilmiş, çoğunluğu prostat tümörlerinin transkript seviyesinde çokça paylaşılmıştır. En sık rastlanan mutasyona uğramış genin (tümörlerin %13'ü) Cul3 bazlı E3 ubiquitin ligazın substrat bağlayıcı alt birimini şifreleyen SPOP olduğu belirlenmiştir (5,167).

İzole SPOP mutasyonları prostat kanserinde rapor edilse de bu gen daha önce herhangi bir malignanside önemli düzeyde mutasyona uğramış olarak bulunmamıştır (140). Bu sebeple araştırmacılar bu geni Amerika ve Avrupadan kişiler üzerinde, 300' ün üzerinde primer tümörü ve metastazı içeren birden çok ek alanda sekansa tabi tutmuşlar, Sanger metodunu kullanarak heterozigot SPOP tekrarları prostat adenokarsinomların %6-13' ünde tanımlanmıştır (Şekil 5.3). Ne 36 iyi huylu prostat doku örneğinde ne 5 prostat stroma örneğinde ne de 6 benzer prostat hücre hattında mutasyon tanımlanmamıştır. SPOP mutasyonları metastatik hastalıkla birlikte (%14.5) 41 yetişkinin 6' sında bulunmuştur. Böylece SPOP mutasyonları lokalize olan ve gelişkin prostat tümörlerini % 6-15' i gibi bir oranda gerçekleştirmiştir.

Bütün SPOP mutasyonları yapısal olarak tanımlanmış substrat bağlayıcı yarıklardaki korunmuş kalıntıları etkilemiştir (Şekil 5.4). Birkaç defalarca değişen kalıntı, substrat etkileşiminde anahtar rol oynamıştır. Dahası, Try87, Trp131 ve Phe133 öndeğişimi substrat bağlayıcı bozmuştur (140). Bu sonuçlar prostat kanserindeki SPOP mutasyonlarının biyolojik olarak bağlı olduğunu kuvvetli bir şekilde akla getirmektedir.



Şekil 5.3. Birden Fazla Alanda Yapılan Çalışmada Mutasyona Uğrayan Genler ve Mutasyon Çeşitleri (140).



Şekil 5.4. SPOP MATH Domaininin Modeli (140).

Yapılan bir çalışmada SPOP ekspresyonunun değişiminin ve SPOP geni somatik mutasyonlarının kanser özelliği gösterip göstermediği amaçlanmıştır. Bunun için çalışmada 45GC (gastrik kanser), 45CRC (kolorektal kanser), 45PCA (prostat kanser) hasta materyalinde SPOP somatik mutasyonu SSCP (single-strand conformation polymorphism)' ye göre analiz edilmiştir. Ayrıca SPOP protein ekspresyonu 60GC, 60CRC, 60PCA' da immünohistokimyasına göre analiz edilmiştir. Genel olarak, sekanslama da SPOP geninin 3 adet somatik missense (yanlış anlam) mutasyonu tespit edilmiştir (p.Ser14Leu, p.Tyr87Cys and p.Phe133Leu). Mutasyonlar 2PCA ve 1CRC' de gözlenmiş, dikkate değer bir biçimde p.Phe133Leu tekrarlayan mutasyon olduğu rapor edilmiştir. Araştırmaya göre, CRC' nin %2.2'sinin ve PCA'nın %4.4'ünün SPOP somatik mutasyonlarını barındırdığı belirlenmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada kolorektal kanserde SPOP geni üzerinde mutasyon bakımından sıcak noktaların bulunduğu 6. ve 7. ekzonlar sekanslanmış, incelenen bu bölgede polimorfik intron delesyonu dışında herhangi bir SPOP mutasyonuna rastlanmamıştır.

Kan ve arkadaşları (117), prostat, akciğer, meme ve yumurtalık kanserlerindeki genom-wide somatik mutasyonları analiz etmiş ve somatik mutasyonlu 1507 adet gen bulmuştur. TP53, KRAS ve PIK3CA gibi bilinen mutasyonlara ek olarak prostat kanserinde ve akciğer kanserinde saptanan SPOP gen mutasyonları dahil olmak üzere bazı yeni mutasyonlar bulmuşlardır.

Ayrıca Berger tarafından yapılan bir başka çalışmada (114), genom-wide sekansa bağlı 7 prostat kanseri analiz edilmiş ve SPOP mutasyonunun 2 missense mutasyonu tespit edilmiştir.

Daha önce yapılan bir mutasyon çalışmasında 7 PCA' dan 2' sinin SPOP somatik mutasyonlarına ev sahipliği yaptığı keşfedilmiştir (%28.6) (114).

Barbieri ve arkadaşları (140) prostat kanserlerindeki SPOP somatik mutasyonlarını tüm ekzon sekansına göre analiz etmişler ve %7.1'inin SPOP mutasyonlarına ev sahipliği yaptığını bulmuşlardır.

Meme kanserinde SPOP lokusunun heterozigotluk kaybına sık rastlanmıştır (%58 kadar) (4).

Bizim yaptığımız çalışmada intronik delesyonlar dışında herhangi bir SPOP mutasyonuna rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalardan farklı olmasının nedeni SPOP genindeki diğer bölgelerde de mutasyon olabilir. İleriki çalışmalarda tüm gen dizi analizi yapılmasıyla daha kesin bir sonuca varılabilir.

Yapılan araştırmalarda BRMS1 geninin mRNA ekspresyonunun metastazı baskılamakla birlikte tümörigenezin gelişimini etkilemediği gösterilmiştir. Bizim bulgularımız da BRMS1 geninin mRNA ekspresyon düzeyini, non-metastatik grupla metastatik grubu ve hasta grubu ile kontrol grubunu karşılaştırdığımızda düşük düzeyde de olsa ($p<0.1$) anlamlı farklılık olduğu bulunmuştur. Örnek sayılarını artırarak daha kapsamlı çalışma yapılması ile bu sonuçların desteklenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında, kolorektal karsinomlarda BRMS1 mRNA ekspresyonu ve SPOP gen mutasyonu, belirli bir olgu serisinde, klinikopatolojik parametrelerle ilişkilendirilerek değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonuçları, literatür eşliğinde, BRMS1 mRNA ekspresyonunun diğer kanser türlerinde olduğu gibi, kolorektal kanser metastazını da baskıladığını tahmin etmekle birlikte daha geniş hasta serisinde çalışılarak kesinleştirilmelidir.

6. KAYNAKÇA

1. Brooks SaS, U (eds). Metastasis Research Protocols. Totowa, Humano Press, 2001: pp 91-101.
2. http://www.uroonkoloji.org/ebulten/pdf/pdf_URO_12.pdf (Erişim tarihi: 17.04.2014)
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100: 57-70.
4. Kim B, Nam HJ, Pyo KE, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is destabilized by the Cul3-SPOP E3 ubiquitin ligase complex. Biochem Biophys Res Commun 2011; 2: 415-420.
5. Nagai Y, Kojima T, Muro Y, et al. Identification of a novel nuclear speckle-type protein, SPOP. FEBS Lett 1997; 24: 23-26.
6. Byun B, Tak H, Joe CO. BTB/POZ domain of speckle-type POZ protein (SPOP) confers proapoptotic function in HeLa cells. BioFactors 2007; 31:165–169.
7. Lee M, Han WS, Kim OK, et al. Prognostic value of p16INK4a and p14ARF gen hypermethylation in human colon cancer. Pathol Res Pract 2006; 202: 415-424.
8. Fenoglio- Preiser CM, Noffsinger AE, et al. Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine. In: Gastrointestinal

pathology an atlas and text (2 nd ed), Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1999; pp 909-1068.

9. John K. Wiencke, Shichun Zheng, Amalia Lafuente, et al. Aberrant methylation of p16INK4a in anatomic and gender-specific subtypes of sporadic colorectal cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1999; 8: 501-506.
10. Christine A. Lacobuzio, D. Elizabeth M. Epithelial neoplasms of the colorectum. In: *Gastrointestinal and Liver Pathology* (2 nd ed), Churchill Livingstone Elsevier 2005; pp 367-394.
11. Rosai J. Gastrointestinal tract. In: *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*, (9th ed), Mosby 2004: 776-855.
12. Parkin DM, Pisoni P, Ferlay J. Estimate of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990 *Int J Cancer* 1990; 80: 827-841.
13. Morson B, Factors influencing the prognosis of early cancer of the rectum. *Proc T Soc Med* 1996; 59: 607-612.
14. Lanspa SJ, Lynch HT, Smyrk TC et al. Colorectal adenomas in the Lynch syndromes. Result of a colonoscopy screening program. *Gastroenterology* 1990; 98: 1117-1122.
15. Buğra D. Kolon, Rektum, Anal Bölge Anatomisi. *Kolorektal Özel Sayısı. Türkiye Klinikleri Journal of Surgery* 2004; 9: 1-9.
16. Buğra D. Genel Konular. Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları. Alemdaroğlu K, Akçal T, Buğra D. İstanbul 2004: ss 17-20.
17. Keith L. Moore Arthur F. Dalley Pelvis ve Perineum, *Klinik Yönelik Anatomi*, Nobel Kitabevi 4.Baskı, İstanbul 2007: ss 385-388.
18. Kodner IJ, Robert D. Colon, Rectum and Anus, *Principles of Surgery*. Schwartz 1999; pp 1284- 1290.
19. Romolo J.L. Embryology and anatomy of the colon. *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract*, Philadelphia 1996; pp 3-16.

20. Buğra D. Kolon Anatomisi. Alemdaroğlu K, Akçal T, Buğra D (Editörler). Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları. İstanbul: Türk Kolon ve Rektum Cerrahi Derneği 2003: ss 21-30.
21. Noffsinger AE, et al. Gastrointestinal Pathology an Atlas and Text. In: Fenoglio-Presier CM. The Normal Anatomy of the Colon, Nonneoplastic Lesions of the Colon, Carcinomas and other Epithelial and Neuroendocrine Tumours of the Large Intestine. (2 th ed), Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1999: pp 747-761.
22. Bozfakıoğlu Y, Muslumano.lu M: Cerrahi Gastroenteroloji. Edit.: Değerli U, Bozfakıoğlu Y. Kolon Hastalıkları. (4. Baskı), İstanbul: Nobel tıp Kitabevi 1997: pp 142-168.
23. Crawford JM, Kumar V. Robbins Temel Patoloji. In Cevikbafl U. Ağız Boşluğu ve Gastrointestinal Sistem (7th ed), İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2003: pp 563-590.
24. Harpaz N, Saxena R: Modern Surgical Pathology. In: Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM. Gastrointestinal Tract, Large Intestine, (1 st ed), Saunders 2003: pp 749-852.
25. Levine DS, Haggitt RC. Histology for Pathologists. In: Sternberg SS. Colon (1 st ed) New York, Raven Press Ltd 1992: pp 573-591.
26. Olah E. Basic Concepts Of Cancer, Genomic Determination. JIFCC 2005; 16: 57-70.
27. Lichtenstein P. N. V, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. N Engl J Med 2000; 343: 78-85.
28. Bertram J. S. The molecular biology of cancer. Mol Aspects Med 2000; 21: 167-223.
29. Jesse D, et al. Molecular Biology of Cancer 2003: pp 1-32.
30. Alberts B, J. A, Lewis J, Martin Raff, et al. Molecular Biology of the Cell. (4th ed), 2002: 23-35.
31. Campisi, J. Aging and cancer cell biology. Aging Cell 2007; 6: pp 261-263.

32. Loeb, L. A, F. C. Christians. Multiple mutations in human cancers. *Mutat Res* 1996; 350: pp 279-286.
33. Kumar, A, Fausto, Michell. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. (8th ed), 2010; pp 817-825.
34. Ponz De Leon M. Pathology of colorectal cancer. *Digest Liver Dis* 2002; 33: pp 372-388.
35. Michor F, Iwasa Y, et al. Dynamics of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol* 2005; 15: pp 484-93.
36. Hamilton Sr, et al. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. In:Hamilton SR, Aaltonen LA. *Tumours of Colon and Rectum*. (1 st ed), Lyon, France:IARC Press 2000; pp 103-143.
37. Dalton P, Chandrasoma P. *Gastrointestinal Pathology*. In: Chandrasoma P. *Colorectal Malignant Neoplasm*. (1st ed). Stamford Connecticut, Appleton&Lange 1999; pp 339-364.
38. Cooper HS. *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*. In: Mills SE. *Intestinal Neoplasms*. (4 th ed), Lippincott Williams &Wilkins 2004; pp 1543-1601.
39. Jass JR. *Diagnostic Histopathology of Tumours*. In Fletcher CDM, Livingstone C. *Tumours of the Small and Large Intestines (Including the Anal region)*. (2nd ed), 2000: pp 369-409.
40. TC Sağlık Bakanlığı, Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı. 2005-2009 Yılları Türkiye Kanseri İnsidansı. 2014: <http://www.kanser.gov.tr/folders/file/8iL-2009-SON.pdf> (Erişim tarihi:12.05.2014)
41. Figen D. Kolorektal karsinomda sınıflama ve prognostik faktörler. *Türk Patoloji Derneği Mezuniyet sonrası Eğitim Toplantısı Gastrointestinal Sistem Patolojisi Günleri*, İstanbul 2005: ss 47- 56.
42. Anne B B, Clive A. Colorectal cancer. *Clinical review. BMJ* 2007; 335: 715-8.

43. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. The gastrointestinal tract. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease (7th ed), Philadelphia: Elsevier Saunders Company 2005: pp 857- 869.
44. O'Brien MJ, et al. The national polyp study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1990; 98: pp 371-379.
45. Lisa Y. Pre-cancerous lesions of the colon: Problems in the diagnosis of dysplasia. (21st ed), European Congress of Pathology, Istanbul 2007: pp 346-348.
46. Ströhle A, Maike W, Hahn A. Nutrition and colorectal cancer. *Med Monatsschr Pharm* 2007; 30: pp 25- 32.
47. Lynch John P, Hoops Timothy C. The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin N Am* 2002; 16: pp 775-810.
48. Garcea, G, R. A. Sharma, et al. Molecular biomarkers of colorectal carcinogenesis and their role in surveillance and early intervention. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1041-1052.
49. Worthley D, et al. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: pp 3784-3791.
50. Hamilton SR, et al. Carcinoma of The Colon Rectum (4th ed), WHO Classification of Tumours of the Digestive System 2010: pp 132-173.
51. Jass J. R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50: p 113-30.
52. Snover, D. C. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Human Pathol. Epub* 2011; 42: pp 1-10.
53. Vogelstein B, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: pp 525-532.
54. Fodde, R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38: 867-871.

55. Takayama T, et al. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol* 2006; 41: 185-192.
56. Cheah P. Y. Recent advances in colorectal cancer genetics and diagnostics. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009; 69: 45-55.
57. Hickman E, et al. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 60-66.
58. Castagnola P, Giaretti W. Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756: 115-125.
59. Andreyev H, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 2001; 85: 692-696.
60. Neumann J, et al. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 2009; 205: 858-862.
61. Davies H, G. R. Bignell, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954.
62. Vakiani E, Solit D. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol* 2011; 223: 219-229.
63. Rajagopalan H, et al. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002; 418:920-934.
64. Woodford-Richens L, et al. SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9719-9723.
65. Klug W, et al. (8th ed), *Concepts of Genetics* 2008: 435-455.
66. Iacopetta B, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol* 2010; 6: 260-269.
67. Houlston R. S. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol* 2001; 54: 206-214.

68. Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* 2002; 84: 27-47.
69. Knudson A. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: pp 820-823.
70. Kulis M, Etseller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 2010; 70: 27-56.
71. Venkatachalam R, et al. The epigenetics of (hereditary) colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 203: pp 1-6.
72. Chuang J, Jones P. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res* 2007; 61: 24-29.
73. Sulewska A, et al. DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45: 149-158.
74. Sulewska A, et al. Detection of DNA methylation in eucaryotic cells. *Folia Histochem Cytobiol*, 2007; 45: 315-324.
75. İlgi S, Gökflen Y. Cerrahi, Gastrointestinal Sistem Anatomisi, Kolorektal Polipler ve Polipozis sendromları, Kolorektal Karsinomlar, Ankara, Güneş Kitabevi 1991; ss 555-567.
76. Menteş B, Leventoğlu S. Kolorektal Kanserlerin Klinik Özellikleri, Kolorektal Özel Sayısı. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery* 2004; 9: ss 36-38.
77. Thomas R, Ira J. Colorectal cancer, Risk factors and recommendations for early detection. *American Family Physician* 1999: 1-12.
78. Redston M. Surgical Pathology of the GI tract, Liver, Biliary tract, and Pancreas (1st ed), Saunders 2004: 441-472.
79. Silverberg SG, et al. Neoplastic diseases of the small and large intestines. In: Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology (4th ed), Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier 2006: pp 1419- 1464.

80. Bon SO, Yik HH, Kong WE, Francis SC. Primary colorectal signet- ring cell carcinoma in Singapore. *ANZ J Surg* 2001; 71: 703-706.
81. Shin S, et al. Characteristics in primary signet-ring cell carcinoma of the colorectum, from clinicopathological observations. *Jpn J Clin Oncol* 1998; 28: 202-206.
82. Wistuba II, et al. Distinc K-ras mutation pattern characterizes signet ring cell colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2003; 9: 3615-3619.
83. Bittorf B, Merkel S, Matzel KE, Wein A, Dimler A, Hohenberger W. Primary signet-ring cell carcinoma of the colorectum. *Langerbecks Arch Surg* 2004 ; 389: 178-183.
84. Mills SE, Carter D, Reuter V, Greenson JK, Stoler MH, Oberman HA. Intestinal neoplasms. In: Stenberg's Diagnostic Surgical Pathology (4th ed), Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2004: pp 1543- 1601.
85. Carpelan- Holmström M, Haglund C, Lundin J, Jarvinen H, Roberts P. Pre-operative serum levels of CA 242 and CEA predict outcome in colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 1996; 32: 1156-1161.
86. Gotzos V, Wintergerst ES, Musy YP, Spichtin HP, Genton CY. Selective distribution of calretinin in adenocarcinomas of the human colon and adjacent tissues. *Am J Surg Pathol*, 1999; 23: 701- 711.
87. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Neoplasia. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease (7th ed), Philadelphia: Elsevier Saunders Company 2005; pp 289-342.
88. Parkin DM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74–108
89. Jemal A, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2007; 57: pp 43–66
90. DeVita VT, Rosenberg SA. Principles and practice of oncology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004; 11: pp 180-197.
91. Bundred NJ. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2001; 27: 137–142.

92. Weiss L. Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin Exp Metastasis* 1992; 10: pp 191–199.
93. Smith I, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 369: pp 29–36.
94. Adjuvant Breast Cancer Trials Collaborative Group, Polychemotherapy for early breast cancer: results from the international adjuvant breast cancer chemotherapy randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 506–515.
95. Clarke M, et al. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365: 1687–1717.
96. Baselga J, et al. Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncologist* 2006; 11: 4–12.
97. Stemmler HJ, et al. Characteristics of patients with brain metastases receiving trastuzumab for HER2 overexpressing metastatic breast cancer. *Breast* 2006; 15: 219–225.
98. Kauffman EC, et al. Metastasis suppression: the evolving role of metastasis suppressor genes for regulating cancer cell growth at the secondary site. *J Urol* 2003; 169: 1122–1133.
99. Yoshida BA, et al. Metastasis suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1717–1730.
100. Seraj MJ, et al. Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13. *Cancer Res* 2000; 60: 2764–2769.
101. Sheng XJ, et al. *Eur J Gynaecol Oncol*, BRMS1 inhibits expression of NF-kappaB subunit p65, uPA and OPN in ovarian cancer cells 2014; 35: 236-242.
102. Balgkouranidou I, et al. *Br J Cancer*, Breast cancer metastasis suppressor-1 promoter methylation in cell-free DNA provides prognostic information in non-small cell lung cancer 2014; 2054-2062.

103. Zhang Y, et al. Expression of breast cancer metastasis suppressor-1, BRMS-1, in human breast cancer and the biological impact of BRMS-1 on the migration of breast cancer cells. 2014; 3: 1417-1426.
104. Chimonidou M, et al. Breast cancer metastasis suppressor-1 promoter methylation in primary breast tumors and corresponding circulating tumor cells. *Mol Cancer Res* 2011; 1248–1257.
105. Wu J, et al. Cloning and characterization of a novel human BRMS1 transcript variant in hepatocellular carcinoma cell 2013; 337: 266-275.
106. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BRMS1> (Erişim tarihi 26.10.2014).
107. Cicek M, Fukuyama R, Welch DR et al, Breast cancer metastasis suppressor 1 inhibits gene expression by targeting nuclear factor-kappaB activity. *Cancer Res* 2005; 65: 3586–3595.
108. Samant RS, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 BRMS1 inhibits osteopontin transcription by abrogating NFkappaB activation. *Cancer Res* 2007; 65: 713–717.
109. Saunders MM, et al. Breast cancer metastatic potential correlates with a breakdown in homospecific and heterospecific gap junctional intercellular communication. *Cancer Res* 2001; 61: 1765–1767.
110. Meehan WJ, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) forms complexes with retinoblastoma- binding protein 1 (RBP1) and the mSin3 histone deacetylase complex and represses transcription. *J Biol Chem* 2004; 279: 1562–1569.
111. Hicks DG, Yoder BJ, Short S et al, Loss of breast cancer metastasis suppressor 1 protein expression predicts reduced disease- free survival in subsets of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6702–6708.
112. Kim MS, Je EM, Oh JE, Yoo NJ, Lee SH. Mutational and expressional analyses of SPOP, a candidate tumor suppressor gene, in prostate, gastric and colorectal cancers 2013; 121: 626-633.

113. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SPOP&search=bd72667b3d0d45a66c2d495e4d5993a8> (Erişim tarihi 26.10.2014).
114. Berger MF, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 2011; 470: 214–220.
115. Li C, et al. Tumor-suppressor role for the SPOP ubiquitin ligase in signal-dependent proteolysis of the oncogenic co-activator SRC-3/AIB1. *Oncogene* 2011; 30: 4350–4364.
116. Nagai Y. et al. Identification of a novel nuclear speckle-type protein, SPOP. *FEBS Lett* 1997; 418: 23–26.
117. Kan, Z. et al. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 2010; 466: 869–873.
118. Du M, Sansores-Garcia L, Zu Z, Wu KK. Cloning and expression analysis of a novel salicylate suppressible gene, Hs-CUL-3, a member of cullin/Cdc53 family. *J Biol Chem* 1998; 273: 89–92.
119. Sumara I, Quadroni M, Frei C, Olma MH, Sumara G, Ricci R, et al. A Cul3-based E3 ligase removes Aurora B from mitotic chromosomes, regulating mitotic progression and completion of cytokinesis in human cells. *Dev Cell* 2007; 12: 887–900.
120. Zapata JM, Pawlowski K, Haas E, Ware CF, Godzik A, Reed JC. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *J Biol Chem* 2001; 276: 42–52.
121. A. Hershko, A. Ciechanover, The ubiquitin system, *Annu. Rev. Biochem* 1998; pp 425–479.
122. Hiroyuki N, Wenwen W, Ayaka K, et al. BRCA1-Associated Protein 1 Interferes with BRCA1/BARD1 RING Heterodimer Activity. *Cancer Res* 2009; 69: 111–9.
123. Güney Y, Bilgihan A. Ubikitin sistem. *T Klin Tıp Bilimleri* 2002; 22: 616–619.
124. H.C. Ardley, P.A. Robinson, E3 ubiquitin ligases, *Essays Biochem* 2005: 15–30.

125. R.J. Deshaies, C.A. Joazeiro, RING domain E3 ubiquitin ligases, *Annu. Rev. Biochem* 2009; 399–434.
126. M.D. Petroski, R.J. Deshaies, Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2005; 9–20.
127. P.J. Stogios, G.S. Downs, J.J. Jauhal, S.K. Nandra, G.G. Prive. Sequence and structural analysis of BTB domain proteins, *Genome Biol* 2005; 78-82.
128. L. Pintard, A. Willems, M. Peter, Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3–BTB complexes join the family, *EMBO J* 2004: 1681–1687.
129. Karen HV, Narra SD, Kenneth LF, et al. BAP1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization. *Cancer Res* 2008; 68: 6953–6962.
130. Glickman M.H, Ciechanover A, The ubiquitin–proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol. Rev* 2002: 373–428.
131. Bayon Y, et al. KCTD5, a putative substrate adaptor for cullin3 ubiquitin ligases, *FEBS J* 2008: 3900–3910.
132. Hurst D.R., et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is stabilized by the Hsp90 chaperone, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2006: 1429–1435.
133. Cerottini JP, Caplin S, Pampallona S, Givel JC. Prognostic factors in colorectal cancer. *Oncol Rep* 1999; 6: 409-414.
134. Sievers F1, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 2011; 11: 537-539.
135. Pourzand, C. and P. Cerutt. Genotypic mutation analysis by RFLP/PCR. *Mutat Res* 1993; 288: 113-121.
136. tip.kou.edu.tr/docs/tibbi_biyoloji/laboratuvarII.doc (Erişim tarihi 26.10.2014)

137. Sambrook J, Maniatis T. Molecular Cloning, 1989: pp 177-189.
138. www.med.unibs.it/~marchesi/pcr.gif (Erişim tarihi 26.10.2014).
139. <http://www.sars.no/facilities/sequencing.php> (Erişim tarihi 26.10.2014).
140. Christopher E, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer, Nature Genetics 2012; 44: 685–689.
141. Piard F, Martin L, Chapusot C, Ponnelle T, Faivre J. Genetic pathways in colorectal cancer, interest for the pathologist. Ann Pathol 2002; 22: 277-288.
142. Resnick MB, Routhier J, Konkin T, Sabo E, Pricolo VE. Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-Catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer, a tissue microarray study. Clinical Cancer Research 2004; 10: 3069-3075.
143. Khorana AA, Ryan CK, Cox C, Eberly S, Sahasrabudhe DM. Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with stage II and stage III colon carcinoma. Cancer 2003; 97: 960-968.
144. Galizia G, et al. Prognostic value of p27, p53, and vascular endothelial growth factor in Dukes A and B colon cancer patients undergoing potentially curative surgery. Dis Colon Rectum 2004; 47: 1904-1914.
145. Okada K, Komuta K, Hashimoto S, Matsuzaki S, Kanematsu T, Koji T. Frequency of Apoptosis of Tumor-infiltrating Lymphocytes Induced by Fas Counterattack in Human Colorectal Carcinoma and its Correlation with Prognosis. Clinical Cancer Research 2000; 6: 3560-3564.
146. Lebedeva IV, Su ZZ, Emdad L, Kolomeyer A, Sarkar D, Kitada S, Waxman S. Targeting inhibition of K- ras enhances Ad. mda-7- induced growth suppression and apoptosis in mutant K-ras colorectal cancer cells. Oncogene 2007; 26: 733- 744.
147. Breeze J. Colorectal cancer. Nursing Times 2001; 97: pp 11-32

148. Galizia G, et al. Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 3490-3499.
149. Kehoe J, Khatri VP. Staging and prognosis of colon cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2006; 15: 129-146.
150. Rich T, Gunderson LL, Lew R, Galdibini JJ, Cohen AM, Donaldson G. Patterns of recurrence of rectal cancer after potentially curative surgery. *Cancer* 1983; 52: 1317-1329.
151. Whittemore AS, Wu-Williams AH, Lee M, Shu Z, Gallagher RP, Deng-ao J. Diet, physical activity and colorectal cancer among Chinese in North America and China. *JNCI J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 915-926.
152. Ströhle A, Maike W, Hahn A. Nutrition and colorectal cancer. *Med Monatsschr Pharm* 2007; 30: 25- 32.
153. Slattery ML, Samowitz W, Ma K, Martaugh M, Sweeney C, Levin TR, Neuhausen S. CYP1A1, cigarette smoking and colon and rectal cancer. *AM J Epidemiol* 2004; 160: 842-852.
154. Mizoue T, Inoue M, Tanaka K, Tsuji I, Wakai K, Nagata C, Tsugane S. Tobacco smoking and colorectal cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. *Jpn J Clin Oncol* 2006; 36: 25-39.
155. Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdm gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993; 71: 2454-2460.
156. Yi Zhang, et al. Effect of BRMS1 on Tumorigenicity and Metastasis of Human Rectal Cancer 2014; pp 505-509.
157. Philip W, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) suppresses metastasis and correlates with improved patient survival in non-small cell lung cancer, *Cancer Letters* 2009; 276: 196–203.

158. Lalita A, et al. Suppression of Human Melanoma Metastasis by the Metastasis Suppressor Gene, BRMS1, *Experimental Cell Research* 2002; 273: 229–239.
159. S. Zhang, Q.-D. Lin & W. Di, Suppression of human ovarian carcinoma metastasis by the metastasis-suppressor gene, BRMS, *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 522–531.
160. Seraj M, et al. The relationship of BRMS1 and RhoGDI2 gene expression to metastatic potential in lineage related human bladder cancer cell lines. *Clinical & Experimental Metastasis* 2000; 18: 519–525.
161. Bogyou Kim, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is destabilized by the Cul3–SPOP E3 ubiquitin ligase complex *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011; 415: 720–726.
162. Edmonds M, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 coordinately regulates metastasis-associated microRNA expression, *Int. J. Cancer* 2009; 125: 1778–1785.
163. Hurst D. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis, *Cancer Res* 2009; 69: 1279–1283.
164. Daskivich T.J, et al. Overtreatment of men with low-risk prostate cancer and significant comorbidity. *Cancer* 2011; 117: 2058–2066.
165. Taylor B.S, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010; 18: 11–22.
166. Kumar A, et al. Exome sequencing identifies a spectrum of mutation frequencies in advanced and lethal prostate cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108: 17087–17092.
167. Zhuang M, et al. Structures of SPOP-substrate complexes: insights into molecular architectures of BTB-Cul3 ubiquitin ligases. *Mol. Cell* 2009; 36: 39–50.

EKLER

ETİK KURUL KARARI

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU											
ETİK KURULUN ADI		: ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
AÇIK ADRES		: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ									
TELEFON		: 0 352 437 49 10 - 11									
FAKS		: 0 352 437 52 85									
E-POSTA		: byancar@erciyes.edu.tr									
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Koleraktal kanser metastazında "BRMS1 Gen ekspresyonu" ve "Spop" Gen Mutasyonu " nun prognostik öneminin araştırılması								
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU										
	KOORDİNATOR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/AD/SOYADI		Doç.Dr. Çetin Saatçi								
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI		Tıbbi Genetik								
	KOORDİNATÖRÜN UNVANI/AD/SOYADI		Doç.Dr. Çetin Saatçi								
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ		Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı/Kaysen								
	DESTEKLEYİCİ										
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ										
	ARAŞTIRMA FAZİ		FAZ 1				FAZ 2				
			FAZ 3				FAZ 4				
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ		Yeni Bir Endikasyon				Yüksek Doz Araştırması					
		Diğer İse Belirtiliniz		☒		Yüksek Lisans Tezi					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		TEKMERKEZ		☒		ÇOKMERKEZ					
		ULUSAL		☒		ULUSLARARASI					
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	BELGE ADI		Tarihi		Versiyon Numarası		Dili				
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ						Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐				
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU						Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐				
	OLGU RAPOR FORMU						Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐				
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ						Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐					
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI		Açıklama								
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ										
	SİGORTA										
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ										
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU										
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ										
	ILAN										
	YILLIK BİLDİRİM										
SONUÇ RAPORU											

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ		
	DİĞER		

ASLI GİBİDİR


Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2012/573	Karar Tarihi : 07.08.2012
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanmış katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI

Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İy Klinik Uygulamalar Kılavuzu

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI : Prof. Dr. Kader KÖSE

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı / Adı Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Tıbbi Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E K X	E H X	E X H	
Prof. Dr. Oğun KONTAŞ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E X K	E H X	E X H	
Prof. Dr. Duran ARSLAN	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E X K	E H X	E X H	
Prof. Dr. Nazan DOLU	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E K X	E H X	E X H	
Prof. Dr. İrfan ÖZYAZGAN	Plastik ve Rekonst.	E.Ü. Tıp Fak.	E X K	E H X	E X H	
Doç. Dr. Polat DURUKAN	Acil Tıp	E.Ü. Tıp Fak.	E X K	E H X	E X H	
Doç. Dr. Fatih TANRIVERDİ	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E X K	E H X	E X H	
Doç. Dr. Leyla HASDIRAZ	Göğüs Cerrahisi	E.Ü. Tıp Fak.	E K X	E H X	E X H	
Doç. Dr. Ertuğrul MAVİLİ	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E X K	E H X	E H X	
Doç. Dr. Hasan B. ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E X K	E H X	E H X	
Doç. Dr. Mehmet A. SOMDAŞ	KBB	Kayseri Eğitim Hastanesi	E X K	E H X	E X H	
Yard. Doç. Dr. Ferhan ELMALI	Biyostatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E X K	E H X	E X H	
Av. Zübeyde ÇELEBİ	Avukat	Hukuk Müşaviri	E K X	E H X	E X H	
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E K X	E H X	E X H	
Yusuf Oğuz ALTUNTAŞ	Sivil Üye	Sivil-Tiyatro Sanatçısı	E X K	E H X	E H X	

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Şerife SAR

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 28 Şubat 1987, ANKARA

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: +90 5056571080

email: serife_sarr@hotmail.com

Yazışma Adresi: Yakacık Mah. Cepken Sok. Güneş Apt. n0:5/10 Keçiören/ ANKARA

EĞİTİM Derece

Yüksek Lisans

Kurum

EÜ Sağlık Bilimleri
Enstitüsü

Mezuniyet Tarihi

2011-

Lisans

EÜ Fen Fakültesi 2011
Biyoloji AD

Lise

Keçiören Kalaba 2004
Lisesi, Ankara

YABANCI DİL

İngilizce