

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

KOLON KANSERLERİNDEKİ K-RAS ve P53 GEN
MUTASYONLARININ DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİ İLE
BELİRLENMESİ

T 91495

UL. YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Mustafa Akkiprik

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç.Dr. Ayşe Özer

İSTANBUL, 1999

İÇİNDEKİLER

Teşekkür.....	i
Özet.....	ii
Abstract.....	iii
Kısaltmalar.....	iv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanserın Moleküler Genetiği.....	1
1.2. Kolon Kanserlerindeki Genetik Değişimler.....	7
1.3. K-ras Onkogeni.....	12
1.3.1. Kolon Kanserlerinde K-ras Gen Mutasyonları.....	15
1.4. p53 Tümör Baskılayıcı Geni.....	17
1.4.1. p53 Geninin Mutasyonel Analizi.....	21
1.4.2. Kolon Kanserlerinde p53 Gen Mutasyonları.....	25
1.5. Kolon Kanserlerinde K-ras ve p53 Gen Değişimlerinin Klinik Önemi.....	26
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	27
2.1. Kullanılan Aletler.....	27
2.2. Kimyasal Maddeler.....	28
2.3. Primerler.....	28
2.4. Kimyasal Çözeltiler.....	28
2.4.1. DNA İzolasyonu.....	28
2.4.2. PZR.....	29
2.4.3. Agaroz Jel Elektrofözezi.....	29
2.4.4. PZR Ürünlerinin Safıaştırılması.....	29
2.4.5. Dizi Analizi Reaksiyonu.....	30
2.4.6. Dizi Analizi Jeli.....	30
2.4.7. Otoradyografi.....	31
2.5. Yöntemler.....	31
2.5.1. Kolon Dokularında DNA İzolasyonu.....	31
2.5.2. PZR.....	32
2.5.3. Agaroz Jel Elektrofözezi.....	33
2.5.4. Dizi Analizi.....	34

2.5.4.1. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	34
2.5.4.2. Dizi Analizi Reaksiyonu.....	35
2.5.4.2.1. Cycle Sequencing.....	36
2.5.4.3. Dizi Analizinde Kullanılan Jelin Hazırlanması.....	38
2.5.4.4. Yüksek Voltaj Dizi Analizi Jel Elektroforezi.....	38
2.5.5. Otoradyografi.....	39
3. BULGULAR.....	40
3.1. DNA İzolasyonu Sonuçları.....	40
3.2. PZR Sonuçları.....	41
3.3. Saflaştırma İşlemi Sonuçları.....	42
3.4. Otoradyografi Sonuçları.....	43
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	47
KAYNAKLAR.....	50
Özgeçmiş.....	54

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmam süresince sahip olduğu bilgi birikimi ve görüşleriyle beni yönlendiren, her zaman desteğini hissettiğim değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ayşe Özer'e;

Bu tez çalışmamın yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında ilgi ve desteğini esirgemeye değerli hocam, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Beyazıt Çırakoğlu'na;

Bu tez çalışmam için gerekli olan dokuların sağlanması konusundaki yardımlarından dolayı, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Cumhuriyet Yeğen'e;

Çalışmalarım süresince ilgi ve dostluklarını her zaman hissettiğim Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalındaki tüm arkadaşlarıma;

Aileme;

TEŞEKKÜRÜ BİR BORÇ BİLİRİM.

ÖZET

Kolon kanserleri birçok genetik değişimin birikimi sonucu oluşmaktadır. Bu genetik değişimler içinde K-ras onkogen mutasyonları ve bir alleldeki mutasyon sonrası diğer allelin kaybı ile giden p53 tümör baskılayıcı gen değişimlerine oldukça yüksek oranlarda rastlanılmaktadır.

Kolon kanserlerinin gelişiminde rol alan genetik mekanizmaların ortaya konması gerek erken tanının sağlanması ve gerekse prognozun belirlenmesi ve buna uygun ilave tedavilerin uygulanmasında moleküler birer belirteç olarak kullanılmalarını sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında, kolon kanserlerinde allele özgü oligonükleotid (ASO) hibridizasyonu yöntemi ile saptanan K-ras ve p53 gen mutasyonlarının doğrulanması ve bu yolla saptanamayanların belirlenmesi amacı ile kolon kanserli hastaların doku örneklerinde DNA dizi analizi yöntemi uygulanmıştır.

Çalışmaya alınan 9 kolon kanserli doku örneğinin birinde K-ras kodon 12 (GGT→GTT) diğerinde (GGT→GAT) olmak üzere toplam 2 örnekte (%22.2) nokta mutasyonu saptanmıştır. Bu doku örneklerinden 8'i p53 mutasyonları için incelemeye alınmış, bir örnekte kodon 248 (CGG→CAG) diğer bir örnekte ise kodon 175 (CGC→CTC) olarak toplam 2 örnekte (%25) nokta mutasyon bulunmuştur. Örneklerin birinde K-ras kodon 12 (GGT→GTT) mutasyonu ile p53 kodon 175 (CGC→CAC) mutasyonunun bir arada olduğu gözlenmiştir. Ayrıca incelenen örneklerde K-ras kodon 13 ve p53 kodon 249 mutasyonlarına rastlanılmamıştır. Elde ettiğimiz bulgular ASO hibridizasyonu sonuçlarını da doğrular niteliktedir.

ABSTRACT

Colon cancers occur with accumulations of many genetic alterations. These alterations include mutations, which are seen more frequently, in the K-ras oncogene and concomitant mutations in one allele together with loss of the other allele of p53 tumor suppressor gene.

The recent observations in molecular mechanisms of colon carcinogenesis may be useful molecular markers for diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of colon cancers.

In this study, DNA sequencing analysis was used to confirm the K-ras and p53 gene mutations shown by allele specific oligonucleotide hybridization (ASO) technique and also detect the ones that could not be shown by the latter.

Nine colon cancer tissue samples were used in this study. K-ras codon 12 mutations were observed in 2 of 9 (22.2%) samples. These mutations resulted from substitution of the wild-type codon (GGT) by either mutant codon (GTT) or (GAT). In eight of these tissue samples p53 mutations were analyzed. Two p53 mutations (25%) were found in two different samples. The first one was at codon 248 (CGG→CAG), and the second one was at codon 175 (CGC→CAC). On the other hand, one of these samples had also mutations for both p53 gene at codon 175 (CGC→CAC), and K-ras gene at codon 12 (GGT→GTT). Moreover, K-ras codon 13 and p53 codon 249 mutations were not found in our studies. Our results confirm the ones of ASO hybridization study of the same samples.

1. GİRİŞ

1.1. KANSERİN MOLEKÜLER GENETİĞİ

Kanser, saldırgan davranışlar sergileyen hücrelerin klonal seçimini teşvik eden mutasyonların birikiminden doğan, genetik bir hastalıktır. Bu süreçte onkogen ve tümör baskılayıcı gen mutasyonları önemli bir yer tutmaktadır. Gerek hücresel ve gerekse çevresel faktörler bu süreci doğrudan etkilemektedir.

1970'li yıllarda kanserin orijini bulmaya yönelik araştırmalara hız verilmiş ve önemli gelişmeler sağlanmıştır. Uzun süre insan kanserine neden olduğu bilinen X-ışınları ile sirke sineği üzerinde yapılan çalışmalar, sineğin genomunda genetik lezyonların oluştuğunu göstererek karsinogenez ve mutagenez arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmıştır (1). Daha sonra Bruce Ames kimyasal mutajenler ve bunların mutasyon potansiyellerini araştırarak salmonella'larda yaptığı çalışmalar ile kimyasalların mutajenik gücü ve memelilerde karsinojenik güç arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Ames, karsinojenlerin mutasyonlara neden olma yetenekleri ile kanser oluşturduğunu açık bir şekilde göstermiştir. Bu hipotez önemli bir ilişki içerir: Kanser hücre genomundaki değişime uğrayan mutant genler kanser sürecinin programlanmasında kritiktir.

Mutasyon oranının artması kanser gelişimini kolaylaştırır. Tümör insidansı ve malignansiye doğru progresyonun hızı mutasyonların frekansına bağlıdır. Mutasyonların oranı çevredeki mutajenlerin etkisi, DNA tamiri, rekombinasyon veya replikasyondaki intrasellüler bir hatadan kaynaklanmaktadır.

Kansere neden olan mutajenler üç grupta toplanır: Kimyasal karsinojenler (Benzen, aromatik aminler; tipik olarak nükleotid dizisinde lokal değişimlere neden olur.) ; iyonize radyasyon (X-ışınları; kromozom kırıkları ve translokasyonlara neden olur.) ; virüsler (HBV; hücre içine kendi DNA'sını sokar.).

İnsan karsinogenezi hücrelerde genetik veya epigenetik olaylar ile seçici bir büyüme avantajının kazanılması ve bunların klonal yayılımından başlayan çok basamaklı bir süreçtir. Deneysel modellerden elde edilen kanıtlar ışığında karsinogenez; inisiyasyon, promosyon, ve progresyon sürecinden oluşan üç evreye bölünebilir (2,3,4). Tümör inisiyasyon karsinojenik ajanların DNA üzerinde direkt

etkilerini içermektedir. Bunun ardından tümör promosyonu gelir. Bu mutajenik olmayan bir etkidir. Terminal farklılaşma regülasyonunun bozulması, sitotoksositeye olan direnç ve büyüme kontrolündeki hatalar ile klonal yayılım gözlenmektedir. Bunlara aynı zamanda sinyal iletimini kontrol eden büyüme faktörleri de etki eder. Bunu progressive fenotipik değişimler ve genetik instabilite (kararsızlık) takip eder. Özellikle onkogen ve tümör baskılayıcı gen hataları belirleyici rol oynamaktadır. Bu genetik değişimler başlangıç hücrelerinin malign bir neoplasma transforme olmalarına neden olmaktadır. Daha sonra tümör hücreleri damar ve lenf dolaşımına geçerek farklı dokulara yayılır ve metastatik kolonileri oluştururlar.

Kanser rastgele meydana gelen genetik kazaların bir serisi sonucudur. Bu süreçte etkilenen iki önemli gen grubu ve kontrolsüz hücre proliferasyonundan invazivliğe doğru giden iki mutasyonel rota vardır. Bunlar kanserin karakteristiğidir. İlki uyarıcı genin hiper aktivitesine yol açar. Bu tip mutasyonlar dominant etkilidir. Hücrenin iki gen kopyasından yalnızca birinin değişimi yeterlidir ve değişen gen onkogen olarak adlandırılır. Normal allel ise proto-onkogendir. İkincisi ise inhibisyona neden olan tümör baskılayıcı genin inaktivasyonudur. Bu mutasyonun tipi genellikle resesif etki gösterir. Hücredeki her iki kopyanın inaktive veya delesyonlu olması gerekmektedir (5).

Proto-onkogenler hücrelerde normal düzenleyici etkiyi naklederler. Peptid hormonlar hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanır ve hücrenin derinliklerine sinyal iletir. Böylece etkiye genetik cevap yönlendirilmektedir. Proto-onkogenlerin rol oynadığı üç biokimyasal mekanizma tanımlanmıştır (6). İlk mekanizma serin, treonin ve tirozini substrat proteinlerin fosforilasyonudur. Örneğin serin/treonin protein kinazlar (raf) gibi bazı büyüme faktörleri bu etkiye neden olmaktadır. İkinci mekanizma bu genlerin GTPaz' lar ile sinyal iletimidir. İlk olarak ras proteinleri keşfedilmiştir. Üçüncü mekanizma ise DNA transkripsiyon mekanizmasından oluşur. Transkripsiyon faktörlerinin büyük bir çoğunluğu proto-onkogenler tarafından kodlanmaktadır (fos,myc,jun,gibi).

Proto-onkogenlerin onkojenik hale dönüşebilmesi için birden fazla yol vardır (Tablo 1.1). 1.) Kodlanan dizide delesyon ya da nokta mutasyon; 2.) gen amplifikasyonu; 3.) kromozomal rearrangement. Özellikle nokta mutasyonlar bir pot-

onkogenin aktif bir onkogene dönüşmesinde, dolayısı ile kanser gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (7).

- | | |
|--|--|
| • Kodlanan dizide delesyon
ya da nokta mutasyon | → Normal miktarlarda
hiper aktif protein yapımı |
| • Gen amplifikasyonu | → Normal proteinin aşırı üretimi |
| • Kromozomal rearrangement | → Yakınındaki güçlü "enhancer", normal
proteinin aşırı üretilmesine neden olur.
→ Hiper aktif füzyon protein |

Normal hücre ve kanser hücreleri ile yapılan füzyon çalışmaları sonucunda hibrid hücrelerin çoğunlukla non-tümörjenik olduğu görülmüş ve tümör hücre genomunda kritik bir lezyon olduğu, bunun normal hücre büyümesinin negatif regülasyonundan sorumlu bir genin kaybı nedeniyle olduğu ortaya konmuştur (8). Bu gen, hücre füzyonu sonrası tümör hücre genomuna yeniden kazandırılmakta, sonuç olarak çoğunlukla normal büyümenin kontrolü restore edilmiş olmaktadır. Bu genler, büyümeyi negatif yönde düzenleyici genler, tümör baskılayıcı genler ya da anti-onkogenler olarak tanımlanmıştır (1).

Bir tümör baskılayıcı genin bir kopyasının kaybı genellikle kansere neden olmaz fakat bu üreme hücrelerinde olursa kansere kalıtsal yatkınlığı artırır. Tümör baskılayıcı genlerde iki geçiş vardır. Biri herediter, diğeri herediter olmayandır. Herediter formda, bir hücrede bir mutasyon kanser gelişimi için yeterlidir. Bir tümör baskılayıcı genin normal allelinin kaybı altı yolla olabilir (Tablo 1.3). Bu durumda heterozigotluğun kaybı (LOH) söz konusudur. Herediter olmayan formda ise tek bir hücrede iki mutasyon gerekir ki bu da oldukça düşük bir ihtimaldir.

Tablo 1.3. Tümör Baskılayıcı Genin Normal Allelinin Kaybolma Yolları

- Nondisjunction (kromozom kaybı)
- Nondisjunction ve duplikasyon
- Mitotik rekombinasyon
- Gen konversiyonu
- Delesyon
- Nokta mutasyonlar

Tablo 1.2. İnsan kanserlerindeki tümör baskılayıcı gen örnekleri (9,10).

<i>TBG</i>	<i>LOKUS</i>	<i>LOKAS- YON / FONKSİ- YON</i>	<i>SOMATİK</i> <i>MAJOR TİP</i>	<i>MUTASYON</i> <i>NEO.ÖRNEĞİ</i>	<i>KALITSAL</i> <i>SENDROM</i>	<i>MUTASYON</i> <i>NEO. ÖRNEĞİ</i>
p53	17p13.1	Nükleus/ transkripsiyon faktörü	Missense	İnsan kanserlerinin birçok tipinde	Li- Fraumeni sendromu	Göğüs ve adre- nal korteks kar- sinomalar; sar- komlar; lösemi; beyin tümörleri
RB1	13q14.3	Nükleus/ transkripsiyon düzenleyi- cisi	Delesyon ve nonsense	Retinoblastom, osteosarkom, göğüs, prostat, mesane ve akelger kansinomları	Retinoblas- tom	Retinoblastom, osteosarkom
APC	5q21	Sitoplaz- ma/ büyü- me sinyali baskılama	Delesyon ve nonsense	Kolon, mide pankreas kansinomlar	Ailesel adenomatöz polipozis koli	Kolon, tiroid ve mide kansinomları
WT1	11p13	Nükleus/ transkripsiyon faktörü	Missense	Wilms tümör	Wilms tümör	Wilms tümör
NF1	17q11.2	Sitoplaz- ma/ guanozin trifosfataz - aktive eden protein	Delesyon	Schwannomlar	Nörofibro- matöz tip 1	Nöral tümörler
NF2	22q12.2	Sitoplaz- ma/sito- skeleton membran bağlantısı	Delesyon ve nonsense	Schwannomlar ve menenjiyom	Nörofibro- matöz tip 2	Santral schwannomlar ve menenjiyomlar
VHL	3p25	Nükleus/ RNAPol.II ile transk. Uzamaı düzenler	Delesyon	Bilinmiyor	von Hippel- Lindau hastalığı	Hemangioblas- tom ve böbrek- hücre kansinomları

Kanseröz büyüme çoğunlukla hücre ölümü ya da farklılaşmasının kontrolünü bozmaya bağlıdır. Farklılaşmanın son evresi ile bölünmemeye doğru hücrelerin normal olgunlaşmasını bloklayan ve normal programlanmış hücre ölümünü önleyen değişimler, bir çok kanserde temel bir rol oynamaktadır.

Tek bir gen hatası hücrelerin *in vivo* büyüme avantajı kazanma ve klonal yayılma başlaması için yeterli değildir. Yapılan çalışmalarda kanser gelişimi için bir hücrede birbirinden bağımsız çeşitli kazaların bir arada olması gerektiği gösterilmiştir. Fare deneyleri tek bir onkogenin normal bir hücreyi kanser hücresine dönüştürmek için genellikle yeterli olmadığını ortaya koymuştur. Myc ve ras onkogenlerini birlikte taşıyan farelerde kanser gelişim riski sadece bir onkogene oranla oldukça yüksektir. *In vivo* ve *in vitro* deneylerde iki ya da daha çok spesifik onkogenin sinerjistik rolü “onkogen işbirliği” olarak tanımlanmıştır (5).

İnsan kanserlerinin yaklaşık olarak %15’i virüs mekanizmaları ile olmaktadır. İlk hayvan virüsü 1910’larda tavukta keşfedildi. Bir retrovirüs olan Rous sarkom virüs src onkogeni ile sarkomaya neden olmaktadır. Daha sonra yapılan çalışmalarda bu genlerin homologları insanlarda bulunmuştur (5).

Tek iplikli viral genoma sahip retrovirüsler transkriptaz enzimi ile DNA’ya transkribe olurlar. Viral DNA daha sonra kromozomal DNA’ya integre olur ve konak hücre, viral genleri kendisine aitmiş gibi ekspres eder. Bu senaryo kanser genlerinin ortaya çıkmasında iki ihtimali ortaya çıkarmaktadır. İlki viral DNA entegrasyonunun potansiyel mutajenik etkisidir. Bu, hücre genlere direkt zarar verir ve viral genomun güçlü düzenleyici elementlerinin kontrolü altında kendi ekspresyonları etkilenir. Bu olaylar “insersiyonel mutagenesis” olarak tanımlanmaktadır. İkinci olarak retroviral ve hücre genleri arası rekombinasyon ile viral genom içine hücre genleri sokabilir ve yeni oluşturulan genlerde onkojenik olabilir. Hücre proto-onkogenlerden retroviral onkogenlerin oluşumu “transdüksiyon” olarak ifade edilmektedir (11).

DNA virüsleri ise konağın DNA replikasyon sistemini kendi hayatta kalma stratejileri ile kullanır, ayrıca bu sistemde anahtar rol oynayan tümör baskılayıcı genleri bloke ederler. Örneğin papilloma virüs E6 ve E7 genleri; SV40 T Large Antijen, Rb ve p53 tümör baskılayıcı genleri inaktive ederler (5).

Çoğu kanser çevresel etkilerin bir kombinasyonundan doğmaktadır. Kanser gelişiminde bir çok aşama ve faktör vardır. Fertlerin genetik yapı farklılığı yanında; diet, yaşam tarzı ve çevre de önemli bir rol oynamaktadır. Amerika Birleşik Devletlerindeki tüm kanserlerin yaklaşık %80’i çevresel faktörler nedeni ile ortaya

çıkılmaktadır (3). Bu yüzden kanser korunulabilir bir kararsızlıktır (12). Tüm bunlar farklı ülkelerdeki insidans farklılığını açıklamaktadır (Tablo 1.4).

Tablo 1.4. Bazı kanserlerin insidansında ülkeler arasındaki varyasyonlar (5).

KANSERİN ORJİN YERİ	<u>Yüksek-İnsidans Popülasyonu</u>		<u>Düşük-İnsidans Popülasyonu</u>	
	Yer	İnsidans*	Yer	İnsidans
Akciğer	ABD (New Orleans, zenciler)	110	Hindistan (Madras)	5.8
Göğüs	Hawaii (Hawaiiiler)	94	İsrail (Yahudi olmayanlar)	14.0
Prostat	ABD (Atlanta, zenciler)	91	Çin (Tianjin)	1.3
Uterin Serviks	Brezilya (Recife)	83	İsrail (Yahudi olmayanlar)	3.0
Mide	Japonya (Nagasaki)	82	Kuveyt (Kuveytililer)	3.7
Karaciğer	Çin (Shanghai)	34	Kanada (Nova Scotia)	0.7
Kolon	ABD (Connecticut, beyazlar)	34	Hindistan (Madras)	1.8
Melanom	Avustralya (Queensland)	31	Japonya (Osaka)	0.2
Nazofarenks	Hong Kong	30	UK (southwestern)	0.3
Özofagus	Fransa (Calvados)	30	Romanya (urban cluj)	1.1
Uterus	ABD (San Francisco Körfez Bölgesi, beyazlar)	26	Hindistan (Nagpur)	1.2
Ovaryum	Yeni Zellanda (Polynesian Adalıları)	26	Kuveyt (Kuveytililer)	3.3
Rektum	İsrail (Avrupa ve ABD doğumlu)	23	Kuveyt (Kuveytililer)	3.0

*İnsidans=100000 popülasyonda yıl başına yeni vakaların sayısı, popülasyondaki yaş dağılımı göz önüne alınarak ayarlanmıştır.

Göğüs, uterin serviks ve yumurtalık kanserleri kadınlar, diğerleri erkekler için değerlendirilmiştir.

Kanserler köken aldıkları hücre tipi ve dokuya göre sınıflandırılırlar. Kanserler epitel tabakası hücrelerinden köken almışsa karsinoma; bağ doku veya kas hücrelerinden köken almışlarsa sarkoma denir. Kanserler sadece bu iki genel kategori içinde yer almazlar, farklı olarak lösemiler; hemopoitik hücrelerden köken alır ve sinir sisteminden köken alan kanserler vardır. Bu genel kategorilerin herbiri tümörün yapısı ve vücuttaki lokalizasyonuna spesifik hücre tipine göre bir çok alt gruplara ayrılır.

Malign tümörlerin isimlendirilmesi, benign tümör isimleri ile ilişkilidir. Bir adenoma, örneğin glandular organizasyonlu bir benign epitel tabaka tümörüdür, malign tümörün ilişkili tipi bir adenokarsinoma olarak adlandırılır. İnsan kanserlerinin yaklaşık olarak %90'ı karsinomadır. Belki vücutta epitel hücrelerde proliferasyonun çok olması, belki de epitelial dokuların kanser gelişimine neden olan kimyasal ve fiziksel zararlara çok sıklıkla maruz kalmasındandır.

1.2. KOLON KANSERLERİNDEKİ GENETİK DEĞİŞİMLER

Kolorektal kanserler (KRK) birbirini takip eden genetik değişimler ile yavaş yavaş ortaya çıkmaktadır. Tek bir hücreden başlayıp, yarım düzine genetik kaza sonucu, benignen malign tümöre ilerleyerek gelişmektedir. Bu ilerleme sürecinde K-ras onkogen mutasyonları ve bir alleldeki mutasyon ile birlikte diğer allelin kaybı ile giden APC, p53 ve DCC gibi tümör baskılayıcı genlerdeki değişimlere oldukça yüksek oranlarda rastlanılmaktadır. Ayrıca diğer bazı genetik mekanizmalar ve çevresel faktörler de KRK gelişimine katkı sağlamaktadır.

Adenoma bir benign neoplazmdır. Buna rağmen genellikle kolon karsinomların kolon adenomadan doğduğu kabul edilmektedir. Bu süreç "adenoma-carcinoma sequence" olarak adlandırılmaktadır (13). Aynı zamanda çoğu adenomanın kolon karsinomaya gelişmediği de bilinmektedir. Adenomaların karsinomaya progresyon sıklığı kesin olarak bilinmediği gibi geçiş zamanı da anlaşılamamıştır. KRK farklı evrelerinin çalışılması tümör progresyonundaki genetik değişimleri gözler önüne sermektedir.

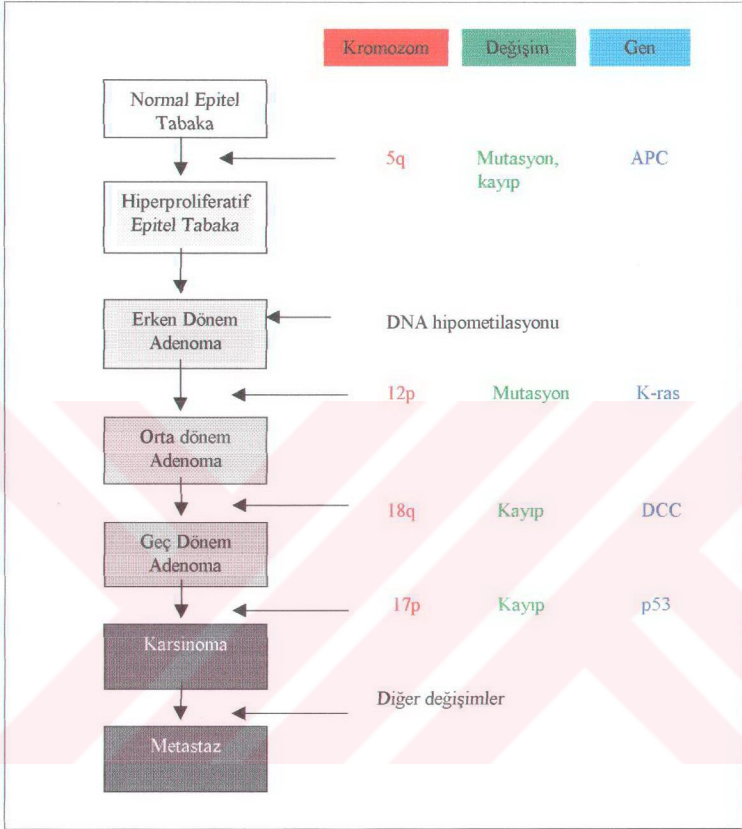
KRK herediter ve herediter olmayan tipleri içermektedir. Herediter KRK'lerin en iyi bilinen iki örneği, ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve herediter polipozis olmayan kolorektal kanser (HNPCC)'dir. Otozomal dominant geçiş gösterirler. FAP pek çok kolonik polip içerirken, HNPCC'de birden çok kolon polipleri yoktur (14). Herediter olmayan tipde ise hastalarda güçlü aile hikayesi bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda FAP ve sporadik kanserli hastaların tümörlerinde kromozom 5q, 17p, 18q'da heterozigositenin kaybı ve bunlarla ilişkili APC, p53, DCC ve K-ras gen

mutasyonları “adenoma-carcinoma sequence” de adenomadan kolorektal karsinoma gelişim mekanizmalarının en önemlileridir (Tablo 1.5).

Kolorektal tümör gelişiminin genetik modeli Bert Vogelstein ve grubu tarafından ortaya konmuştur (Şekil 1.1) (15). Sporadik kolorektal tümörlerde K-ras kodon 12, 13 ve 61 mutasyonları 1cm’den küçük adenomların %9’unda, 1cm’den büyük adenomların %58’inde ve karsinomaların %47’inde görülmüştür. 5q kayıpları ise adenomaların %29, karsinomaların %35’inde gözlenmiştir. Son yapılan çalışmalarda APC mutasyonlarına adenomalarda %63, karsinomalarda %60 oranında rastlanmaktadır (16,17). Erken dönem adenomların yalnızca %11-13’ünde 18q kayıplarına rastlanırken geç dönem adenomların %47’inde, karsinomaların %73’ünde rastlanmaktadır. 17p’nin allelik kaybı erken dönem ve orta dönem adenomalarda %6, geç dönem adenomalarda %24, karsinomalarda ise %75 oranında rastlanmaktadır. Karsinomaların %90’dan fazlası bu dört değişimin (ras,5q,17p,18q) en az ikisi veya daha fazlasını içermektedir. Buna karşın, erken dönem adenomaların %7’inde bu dört genetik değişimden biri veya daha çoğuna rastlanırken, bu yüzde giderek artarak %25 ve %49 orta dönemden geç dönem adenomaya ilerlemektedir. Enteresan olarak geç dönem adenoma tüm bu genetik değişimleri içermektedir (18).

Tablo 1.5 : Kolorektal tümör gelişiminde rol alan genler (16).

Gen	Tip	Kromozom	Hücre Yerleşimi	Fonksiyon
APC	TBG	5q21-22	Sitoplazma	Büyüme sinyali inhibisyonu
DCC	TBG	18q21	Hücre membranı	Hücre-hücre adezyon, hücre matriks etkileşimi
p53	TBG	17p13.1	Nükleus	Transkripsiyon faktörü, büyüme inhibisyonu , hücre döngüsü kontrolü
K-ras	Proto-onkogen	12p12.1	Hücre membranı/ sitoplazma	İntrasellüler sinyal iletimi



Şekil 1.1 Kolorektal kanserlerin gelişim modeli (15).

Çoğunlukla malign kolorektal karsinoma adenomadan köken almaktadır. Adenoma gelişimi bir APC allelinin mutasyonunu takiben ikinci APC allelinin kaybına (LOH) ihtiyaç duyar. Eğer K-ras mutasyonu ilk olarak meydana gelirse, klonal popülasyon nonneoplastik lezyon olarak gelişir. Normal APC proteinin yokluğu, normal büyüme inhibisyon sinyalini engeller ve hücreler klonal olarak erken dönem adenomaya doğru ilerlerler. Bunun hemen ardından adenomadaki bir hücre diğer bir mutasyon kazanır, bu da K-ras onkogenidir. Bu mutasyon hücrelerin klonal olarak

yayılımını, belki de orijinal poliplerin daha da büyümesini ve adenomanın genişlemesini sağlamaktadır. Büyümenin artarak ilerlemesi sırasında, diğer mutasyonların kademeli birikimi mutant APC/K-ras klonları alt klonlarının gelişmesini sağlar. Bu biriken hatalar DCC ve p53 gen mutasyonlarını içermektedir. Bunun ardından DCC lokusunu takiben p53 lokusunda LOH meydana gelir. Bu şekilde benign fenotipten malignasiye geçiş gerçekleşmiş olur. LOH olayları tümör baskılayıcı gen lokuslarında belirgin olmayan mutasyonları açığa çıkarır ve daha ileri neoplastik progresyona yardımcı olur. Sonuç olarak metastazlar gelişir.

KRK gelişimine eğilimi olan iki kalıtsal formdan biri olan HNPCC, mikrosatellit instabilitesi ile karakterizedir (16,19). Bu hastalarda LOH ya hiç yoktur, ya da çok azdır. Bu tümörler mutasyonlara çok açıktır çünkü DNA mismatch repair (MMR) sistemi defektiftir. Bu sistemin genleri (hMSH2, hMLH1, PMS1, PMS2) HNPCC hastalarında üreme hücre mutasyonlarını taşımaktadır. MMR sistem, hatalı baz eşleşmesini ve DNA replikasyonu sırasında büyük bir olasılıkla doğru bir şekilde kopya edilemeyen DNA'nın küçük tekrar dizilerini (mikrosatellite) direkt olarak tanıyıp ve tamir eder. Hatalı baz eşleşmesi eğer tamir mekanizması tarafından tanınmaz ise nükleotid transisyon ve transversiyonlarına neden olur ve orijinal genetik dizide değişiklikler gerçekleşir. Nokta mutasyonlar büyümeyi kontrol eden genlerde olabilir. Mikrosatellit instabilitesi HNPCC vakalarının %80'inden fazlasında görülürken sporadik KRK'lerin %13-22'sinde tanımlanmıştır (17) ve MMR genlerinin mutasyonları ile ilişkilidir.

DNA metilasyonunun değişimleri KRK gelişiminde önemli bir epigenetik faktördür. KRK'lerdeki DNA metilasyonunun dört yolu vardır : 1-) 5-Metil sitozin kontentlerinin azalması ile global hipometilasyon ve spesifik genlerin progressif hipometilasyonu ; 2-) artmış DNA metil transferaz ekspresyonu ve aktivitesi sonucu DNA metilasyon kapasitesinin artması ; 3-) spesifik genlerin CpG adacıklarının bölgesel hipermetilasyonu ; ve 4-) 5-metil sitozin (5-mC) deaminasyonu sonucunda C→T transisyonları nedeniyle mutasyonun artan oranları. Bu değişimler kromatin konformasyonel değişimleri, genetik instabilite, onkogenlerin ekspresyonlarının artması, TBG'lerin transkripsiyonel inaktivasyonu ile sonuçlanabilir. Bölgesel

hipermetilasyon TBG inaktivasyonunun bir nedeni olan nokta mutasyon ve allelik kayıplara alternatif olarak rol oynamaktadır (17).

Kolorektal tümörlerde onkogen ve TBG'lerin yapısal değişimleri yanında diğer bazı gen ve gen ürünlerinin aktivite ya da ekspresyonlarında farklılıklar belirlenmiştir. Örneğin çoğu kolorektal karsinomada c-myc yüksek düzeylerde eksprese edilmektedir. Spesifik proteinlerin tirozin kinaz aktiviteleri de çoğu kolorektal karsinomada yüksektir. Bazı aktiviteler dikkate değerdir çünkü benzer aktiviteler çeşitli onkogenler ile ilişkilidir. C-myc nükleer bir fosfoproteini kodlamaktadır. Hücre proliferasyonu sırasında indüklenir ve muhtemelen DNA sentezi için gereklidir. Artmış c-myc düzeyi kolorektal adenomalar ve karsinomaların %60-70'inde tesbit edilmiştir (17). Ayrıca yapılan çalışmalarda c-myc onkogeninin yüksek aktivitesi bu tümörlerde bulunmuştur. C-myc molekülü src tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. Bu proteinler normal hücrelerde sinyal iletimi, farklılaşma ve proliferasyon ile ilişkilidir.

KRK gelişiminde telomeraz aktivitesinin de rol oynadığı yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (17). İlerleyen telomer kısalması, kontrolsüz hücre proliferasyonunun önlenmesinde önemli bir mekanizmadır. Bu, telomeraz enzimi ile önlenenebilir. Telomeraz enzimi normal somatik hücrelerde eksprese edilmemektedir. Çalışmalarda KRK örneklerinin tümünde telomeraz ekspresyonu aktive edilmiştir. Telomeraz aktivitesi KRK'lerde gözlenmiş fakat adenomatöz poliplerde gözlenmemiştir.

Genetik değişimlerin yanı sıra çevresel faktörler de KRK gelişimine katkı sağlamaktadır. İleri yaş, aile hikayesi yanında, diet, yüksek kırmızı et ve doymuş yağ tüketimi riski artırırken; sebze, meyve, fiber, folat ve kalsiyum koruyucu olabilmektedir. Ayrıca düzenli bir fiziksel aktivitenin KRK riskini azalttığı bilinmektedir. Doll ve Peto KRK'lerin %85'inden daha fazlasını çevresel faktörlerle açıklamaktadır (20). Eğer çevresel faktörler tanımlanabilirse çoğu KRK önlenebilir.

KRK'lerin gelişiminde rol alan genetik mekanizmaların ortaya konması gerek erken tanının konması ve gerekse ileri dönemlerde prognozun belirlenmesi ve buna uygun ilave tedavilerin uygulanmasında moleküler birer belirteç olarak kullanılmasını sağlayacaktır. Ayrıca yüksek risk gruplarının tanımlanmasına da yardımcı olacaktır.

1.3. K-RAS ONKOGENİ

Ras genlerinin kodon 12,13 ve 61' deki mutasyonları bu genleri aktif onkogenlere dönüştürmektedir. Ras gen mutasyonları tümör tiplerinde farklı insidanslarda bulunmaktadır. En yüksek insidansları, pankreas (%90), kolon (%50) ve akciğer adenokarsinomalarında (%30); tiroid tümörlerinde (%50) ve myeloid lösemilerinde (%30) rastlanmaktadır (21). Bu kanserler içinde özellikle k-ras geni mutasyonları diğer ras genlerine (N-ras ve H-ras) oranla daha sık görülmektedir.

Tanımlanan ilk ras geni (v-ras) belirli akut transforme edici retrovirüslerin viral onkogenleridir. Retroviral onkogenlerin normal hücrel genlerden köken aldığı ortaya çıkmasından sonra "NIH/3T3 hücre transformasyon assay" ile tanımlanmış transforme edici genlerin çoğunun hücrel genler (c-ras) olduğu ve bunların nokta mutasyonlar ile aktive edildiği gösterilmiştir. H-ras, Harvey'in v-H-ras'ına ve k-ras, Kirsten (Ki) murine sarkoma virüsünün (MuSV) v-k-ras'ına yol açar. N-ras ise diğer ras genlerine homoloji gösteren bir transforme edici gen olarak nöroblastoma hücre serilerinde bulunmaktadır (21).

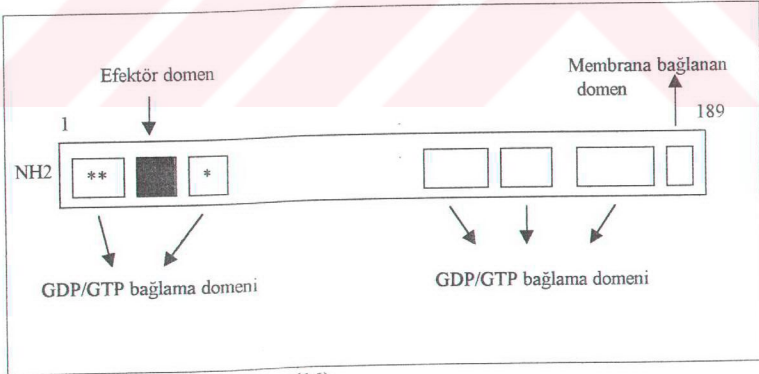
Aktive olmuş c-ras genlerine insan kanserlerinin bir çok tipinde (%30) rastlanmaktadır. Tümör oluşumundaki bu rolünün yanında, normal ras genleri özellikle hücre büyümesi ve farklılaşması gibi bazı fizyolojik fonksiyonların kritik düzenleyicisidir. Ras'ın bu normal aktivitesi, onun sinyal iletimi patikalarının ortasındaki anahtar pozisyonundan kaynaklanmaktadır (22).

Mutasyonların sıklığı üç ras genine muntazam olarak dağılmamıştır. İlk olarak H-ras gen mutasyonları keşfedilmiş olsa da daha sonra yapılan yoğun çalışmalar K-ras ve N-ras mutasyonlarının insan kanserlerinde daha sık görüldüğünü ortaya çıkarmıştır. Mutant k-ras geni pankreas, kolon ve akciğer adenokarsinomalarında daha yaygın iken, mutant N-ras daha çok hematopoietik neoplazmlarda görülür. Bazı tümör tiplerinde ise örneğin tiroid tümörlerinde herhangi bir spesifiklik gözlenmemektedir. Üç ras genini kodlayan proteinler güçlü amino asit benzerliği (%90) gösterirler. Hücre kültürü ve hayvan deneylerinde aynı güçlü transforme edici etkiyi sergilerler. H-ras, N-ras ve K-ras (4A ve 4B izoform)'ın biyokimyasal ve biyolojik özelliklerinin temel olarak özdeş olduğu var sayılmaktadır (23).

Ras genlerinin tümü çoğu dokuda eksprese edilir fakat her genin ekspresyon düzeyi farklıdır. Yapılan çalışmalarda çoğunlukla mutant ras geninin tipi ve dokudaki ekspresyon düzeyi arasında herhangi bir bağlantı kurulamamıştır (21).

Tüm ras genleri farklı kromozomlar üzerinde lokalize olmasına rağmen tümü 21 kD'luk bir protein kodlamaktadır. Bunlardan K-ras kromozom 12'nin kısa kolunda (12p12.1) lokalizedir. Dört ekzon içeren K-ras geninde dördüncü ekzon alternatif olarak kırılırken, 4A ekzonlu transkript 189 amino asit; 4B transkript ise 188 amino asitli bir protein üretmektedir (Şekil 1.2) (16). Bunlar arasındaki fark karboksil uçtaki 25 amino asittir. Bu transkriptlerden 4B varyantı 10-20 kat daha fazla eksprese edilmektedir (23).

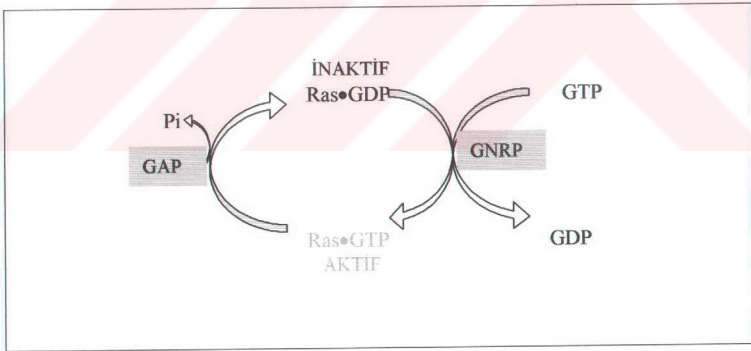
Ras proteinlerinin biyolojik aktivasyonu için lipid modifikasyonu ve plazma membranına kuvvetli bağlanması gerekmektedir. Ras proteinleri başlangıçta inaktif sitoplazmik protein olarak sentezlenir. Daha sonra bir dizi posttranslasyonel modifikasyona uğrayarak plazma membranının iç yüzeyine transloke edilirler. Karboksi ucun modifikasyonu proteinin hidrofobik özelliğini artırır, ras membran bağlantısına katkı sağlar (22, 23).



Şekil 1.2 K-ras proteininin yapısı (16).

Normalde ras proteinleri GDP bağı inaktif formdadır. Ekstrasellüler ligandların bir çeşidi ile hücre yüzeyinde stimülasyon başlatılır. Sitokinler (interlükin), nörotransmitterler (carbachol), hormonlar (insülin) ve büyüme faktörleri (EGF) ile geçici olarak aktive edilirler (23). Guanin nükleotidi salıveren proteinler (GNRPs), örneğin (SOS1/2, Ras GRF/CDC25) inaktif formdaki GDP yerine GTP bağlayarak aktif forma dönüşümü (Ras•GTP) sağlar. Aktif ras, bu uyarıların oluşturduğu sinyali ilettikten kısa bir süre sonra tekrar inaktif formuna (Ras•GDP) dönüştürülür. GTPaz aktive eden proteinler (GAPs) örneğin p120,NF1-GAP ras'ın intrinsik GTP hidrolizini uyarır ve onun inaktif formuna dönüşmesine neden olur (Şekil 1.3) (16).

İnsan kanserlerindeki mutant ras genleri (kodon 12,13 ve 61) bu onkojenik mutant ras proteinlerini GAP stimülasyonuna duyarsız yapmaktadır. Mutantlar dış uyarı yokluğunda bile aktivitelerini korurlar. En önemli mutant formlar kodon 12,13 ve 61'de lokalizasyon göstermektedir. Bu kodonlar ras proteininin katalitik aktivite ve GTP/GDP bağlama bölgesine denk gelmektedir (16, 22).



Şekil 1.3 Ras proteinlerinin inaktivasyon ve aktivasyon mekanizması (5).

Ras proteinlerinin aktivasyon ve inaktivasyonunu tetikleyen GNRP ve GAP'ler reseptör tirozin kinazlar ile kontrol edilmektedir. Aktive olan ras, MAP kinaz uyarımını sağlamaktadır. MAP kinazlar uyarıldığında hücrede çeşitli proteinlerin fosforilasyonu sinyalinin naklediler (22). Bunlar içinde gen düzenleyici proteinler ve diğer protein kinazlar bulunmaktadır. Gerek jun proteinin direkt fosforilasyonu ve gerekse SRF Elk-1 kompleks proteininin fosforilasyonu ile dolaylı olarak fos geninin transkripsiyonel aktivasyonu hücreyi proliferasyona sürüklemektedir.

Ras mutasyonları yalnız başına normal hücrelerin bütünüyle malign yapıya dönüşümleri için genellikle yeterli olmamaktadır. Bu dönüşüm için diğer onkogenlerin veya ras ile birlikte diğer genetik hataların (örneğin tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonlarının kaybı) bir arada olması gerekmektedir (22, 23).

1.3.1. Kolon Kanserlerinde K-ras Gen Mutasyonları

Kolorektal tümörlerde K-ras kodon 12,13 ve 61 mutasyonları, 1cm'den küçük adenomaların %9'u, 1cm'den büyük adenomaların %58'inde ve karsinomaların %47'sinde bulunmaktadır (18). Kodon 12 mutasyonları kolorektal tümörlerde en sık rastlanılan K-ras mutantlarıdır. Bu mutasyon kodon 13 ve 61'deki gibi, her zaman bir missens mutasyondur. Kodon 12'deki glisin amino asidi başka bir amino aside dönüşmektedir (Tablo 1.4).

Tablo 1.4 K-ras mutasyon dağılımı (n=60) (21).

Mutasyon	Yüzdesi (%)
K12 GGT→Gly (Normal)	
AGT→Ser	12
TGT→Cys	12
CGT→Arg	0
GAT→Asp	16
GTT→Val	37
GCT→Ala	7
K13 GGC→GAC	21

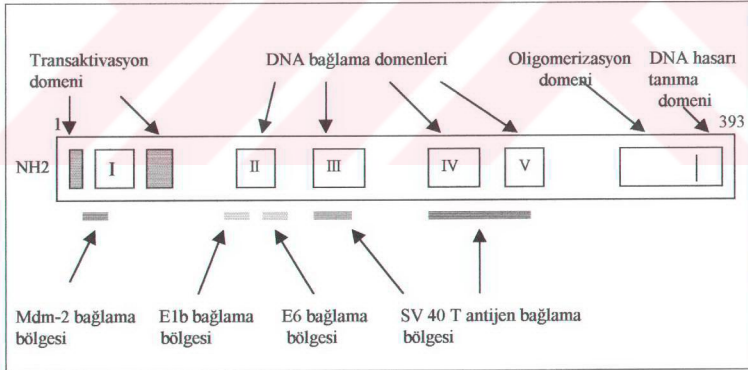
K-ras mutasyonlarının APC gen değişimleri sonrası, ileri adenoma döneminde meydana geldiği gösterilmiştir. K-ras mutasyonları APC mutasyonlu küçük adenomalarda %20'den daha az bulunmuştur. Fakat kolorektal kanser gelişiminde oldukça erken bir preneoplastik lezyon olarak görülen "Aberrant Crypt Foci" (ACF)'de bile anlamlı derecede K-ras mutasyonları saptanmaktadır (24). Ayrıca ACF'de APC mutasyonu yokluğunda çoğunlukla nonneoplastik olarak kaldığı, APC mutasyonu varlığında ise displastik olduğu ve adenomaların öncülüğünü yaptığı ileri sürülmektedir (16). Dolayısı ile K-ras mutasyonlarının tek başına malign dönüşümler için yeterli olmadığı düşünölmektedir.



1.4. p53 TÜMÖR BASKILAYICI GENİ

Nükleer bir fosfoprotein olan p53 ilk olarak 1979'da keşfedildi. p53 proteini ilk önceleri bir tümör antijeni, bir onkogen olarak tanımlanmış fakat daha sonraları yabancı p53'ün insan kanser hücre serilerinin büyümesini ve hücre transformasyonunu inhibe ettiği, dolayısıyla bir tümör baskılayıcı gen olduğu gösterilmiştir. p53 TBG'nin onkovirüsler veya insan tümörlerindeki yapısal değişimleri p53 gen ürününün inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (16).

Kromozom 17p13.1'deki p53 geni, 11 ekzon içerir ve 393 amino asitli bir protein kodlar. Çeşitli türler arasında oldukça iyi korunmuş beş domeni vardır. Bu domenler dizi spesifik DNA bağlamada oldukça önemlidir. Amino uç bölgesi transkripsiyon, karboksî ucu ise bir oligomerizasyon domenine sahiptir. Oligomerizasyon domeni p53'ün tetramer formunun oluşmasını sağlamaktadır. Ayrıca karboksil ucun bir kısmı birincil DNA zararını tanıyan bir domen içermektedir (Şekil 1.4) (16).



Şekil 1.4. p53 protein yapısı (16).

p53, gen ekspresyonunu aktive edebilen bir transkripsiyon faktörüdür. Bir tetramer olarak p53, bu genlerin transkripsiyonunu güçlendirmek için onların promotör bölgelerindeki DNA dizilerine bağlanmaktadır. Bir çok gen p53 tarafından aktive

edilmektedir (Tablo 1.5) (25). Bu genler özellikle hücre döngüsünün kontrolü, DNA tamiri ve sentezi, büyüme kontrolü ve apoptozis ile ilgilidir. Bu yüzden p53 fonksiyonunun inaktivasyonu kontrolsüz hücre büyümesi ve bölünmesine neden olmaktadır. p53'ün dizi spesifik DNA bağlama domeni 102-292 amino asitler arasında lokalizedir. Tetramerik p53 proteini 10 bç'lik "5-PuPuPuC(A/T)(A/T) GPyPyPy-3" motifinin iki kopyasını bağlar. Bu 10 bç'lik motifin bir kopyası bağlanma için yeterli değildir. Ayrıca gerekli olan iki kopyasında 13 bç'den fazla rastgele diziler ile ayrılmış olması gerekmektedir. p53'ün bağlandığı DNA dizisi bir simetriye sahiptir. 5-(A/T)GPyPyPy yarı dizisinin dört kopyası zıt yönde oryante olmuştur. Bu da p53'ün bir tetramerik protein olarak bu bölgeye bağlandığını göstermektedir (26).

p53 mutasyonları tüm insan kanserlerinin yarısından fazlasında bulunmaktadır (27). Bu da onu insan karsinogenezisindeki biokimyasal olayların merkezinde bir unsur yapmaktadır. p53 mutasyonlarının en önemlisi missens (bir amino asit değişimine neden olur) mutasyonlarıdır ve bu karakteristik olarak yabancı allelin LOH ile ilişkilidir. Ek olarak, diğer mekanizmalar p53'ün çeşitli türler arasında oldukça iyi korunmuş bölgesini hedef alarak p53'ün inaktivasyonuna neden olmaktadır.

Tablo 1.5. p53 tarafından aktive edilen genlerin ürünleri (25).	
p21, WAF1,cip1	Çeşitli siklin-siklin bağımlı kinazları inhibe eder; siklinler ve PCNA'ye bağlanır; hücre siklüsünü durdurur.
MDM2	Bir onkogen ürünü; p53 aracılı transkripsiyonu inhibe ve p53 aktivitesini otoregüle eder.
GADD45	DNA zararında ündüklenir; PCNA'ya bağlanır ve hücre siklüsünü durdurabilir; DNA nükleotid eksizyon (çıkarm) tamirinde direkt olarak etkilidir.
Siklin G	Fonksiyonu tam olarak bilinmeyen yeni bir siklin
Bax	Apoptozisi güçlendiren Bcl2 ailesinin bir üyesi; Tüm hücrelerde p53 ile ündüklenmez.
IGF-BP3	İnsülin-benzeri büyüme faktörü bağlayan protein-3; bir mitojenik büyüme faktörünün sinyalini bloklar.

Bunlar içinde p53'e viral proteinlerin bağlanması (SV40 T large antijen, HPV E6 protein ve adenovirüs E1B proteini) ve amplifiye olmuş hücrel proteinlerin bağlanması (sarkoma hastalarında mdm2 onkoproteini) bulunmaktadır. Mutant p53 (normal p53'ün yokluğunun eşliğinde) tümörlerde aşırı üretilmekte ve immünohistokimyasal metodlar ile tanımlanabilmektedir. Bu aşırı üretim, mutant p53 proteininin stabilitesinin güçlendirilmesi sonucu hücre içinde birikimini açıklamaktadır.

p53 normal hücre büyümesi ve bölünmesinin önemli bir negatif regülatörüdür. DNA hasarının farklı tipleri p53'ü aktive edebilir, örneğin γ -ışınlama ile DNA'da çift zincir kırıklar oluşur ve DNA'ya zarar veren kimyasallar veya ultraviolele irradasyon sonrası DNA tamiri için ara verilir. Bu, hücrelerde p53 düzeyinin hızla artması ve p53'ün bir transkripsiyon faktörü olarak aktivasyonuna neden olmaktadır. Aktive olan p53 bir çok genin transkripsiyonunu açar. Bunlar WAF1/cip1'in aktivasyonunu içermektedir. Üretilen 21 kD'luk protein siklin bağımlı kinaz-2'yi inhibe eder. Böylece hücre siklusunun G1 fazında hücre bloklanır ve zarara uğramış DNA'nın replikasyonu önlenir. p53 aynı zamanda GADD45'in transkripsiyonunu da uyarmaktadır. Bu protein proliferasyon hücre nükleer antijen (PCNA) ile kompleks yapmaktadır. PCNA, DNA zararı uzaklaştırıldıktan sonra DNA'nın yeniden sentezi için gerekli bir unsurdur. Bir hipoteze göre hücrel proteinler DNA hasarını tanıyarak p53 ile iletişim kurmakta ve onu aktive etmektedir. Örneğin ATM geni defektif hücre kültürlerinde p53'ün iyonize radyasyona cevabı zayıflamakta ve gecikmektedir (25, 28). Bu bulgular ışığında ATM geninin DNA hasarını tanıdığı ve protein kinaz domeni ile p53'e sinyal iletebildiği ileri sürülmektedir. Fakat p53 proteinin DNA zarar bölgesine kendi kendine bağlanabildiği bilinmektedir. Burada ise birbirinden bağımsız iki mekanizma olabilir: p53'ün DNA hasarını direkt tanınması ve bir hasar-dedektör proteininin DNA zararını tanınması ve iletmesi. Bu şekilde DNA zararı p53'ün fonksiyonel cevabı öncesi iki bağımsız mekanizma ile kontrol edilebilmektedir.

G2 kontrol noktası hatasız bir mitozun gerçekleşmesi için oldukça önemlidir. Bu noktada iç iplikçiklerinin bir araya gelmesi kontrol edilir. Myeloid hücrelerde p53'ün kaybı veya mutant p53'ün aşırı üretiminin poliploidite ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu bulgu p53'ün G2 kontrol noktasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. p53'ün yokluğu güçlü genom düzensizliğini gösterir ve anormal sentrozomların

amplifikasyonuna neden olur (29). p53 aynı zamanda transkripsiyon faktörü 2H-ilişkili proteinlere bağlanabilmektedir. Bu proteinler (DNA helikaz, XPB(ERCC3)), DNA zararı tamir mekanizmasında görev almaktadır.

DNA zararına ilave olarak, hipoksi de p53 düzeyini uyarır ve p53 proteinini aktive edebilir. Bu da p53'ün kanser oluşumuna karşı diğer bir koruyucu etkisini ortaya koymaktadır. Bir çok kanserde aşırı hücre proliferasyonu sonucu kritik bir büyüklüğe ulaşmaktadır. Büyümenin devamı için kan ihtiyacı dolayısı ile anjiogenik faktörlere ihtiyaç vardır. Oluşan hipoksi p53 aktivitesine neden olur ve bazı hücreleri öldürür. Aynı zamanda bir anti-anjiogenik faktör olan trombospodin geninin p53 ile regüle edildiği ortaya konmuştur (25).

Multi drug-resistance geni MDR1, sitotoksik ilaçlara dirençten sorumludur. Çoğu kanserde kemoterapinin başarısızlığı ve radyo terapiye tümör direnci sağlayarak tedaviyi etkisiz kılmaktan sorumludur. Yapılan çalışmalarda belirli mutant p53 tiplerinin MDR1 ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir (25).

p53 proteini aynı zamanda programlı hücre ölümü veya apoptozisde de önemli bir rol oynamaktadır. p53 çeşitli fizyolojik koşullar altında apoptozise neden olmaktadır. Normal timositler DNA zararına cevap olarak apoptozise uğrarlar, fakat p53-/- fare timositleri aynı uyarıya aynı cevabı vermezler. Ayrıca tüm apoptotik olayların p53 aracılı olmadığı bilinmektedir. p53 aynı zamanda viral veya hücreyel bir onkogen ekspresyonu veya kritik bir tümör baskılayıcı gen ürününün (Rb) yokluğuna cevap olarak da apoptozisi başlatabilmektedir (25).

p53, transkripsiyonel aktivasyonu veya direkt protein sinyal iletimi (protein-protein etkileşimi veya diğer bazı aktiviteler ile) ya da her ikisini birden kullanarak apoptozisi başlatabilmektedir (25). p53 tarafından regüle edilen iki gen (en azında bazı hücrelerde) hücrelerde apoptozis kararının verilmesinde etkilidir. Bunlar bax ve IGF-BP3 genleridir. Bcl2'nin (ya da AV E1B-19 kD proteini) aşırı üretimi p53-aracılı apoptozisi blokluyabildiği bilinmektedir. Bax Bcl2'ye bağlanır ve apoptozisi önleme yeteneğine karşı etki gösterir, dolayısı ile p53-bağımlı bax sentezi apoptozise doğru bir tırmanmaya işaret etmektedir. Bcl2-Bax ailesi gen ürünlerinin etki mekanizması bilinmemektedir. Kanser hücrelerinin gelişiminin anlaşılmasında bu önemli bulgu odak noktayı oluşturmaktadır. p53 tarafından regüle edilen ikinci bir gen ürünüde büyümeyi

regüle edebilen insülin-like growth factor-binding protein3 (IGF-BP3)'dür. IGF-BP3 IGF'ye bağlanarak IGF mitotik sinyal iletimini bloklar ve onun reseptörü ile etkileşimini önler. Böylece IGF aktivitesininin bloklanması apoptozisi güçlendirebilir veya hücrelerin mitojenik cevabı azalabilir.

p53, hücre döngüsünün kontrolü, DNA tamiri ve sentezi, genomik plastisite ve apoptozis gibi fonksiyonları ile somatik hücrelerde insan DNA'sının doğasında var olan mutasyonlanma kontrolünü elinde tutmaktadır. Bu özellikleri ile p53 genom gardiyanı olarak nitelendirilmiştir (30).

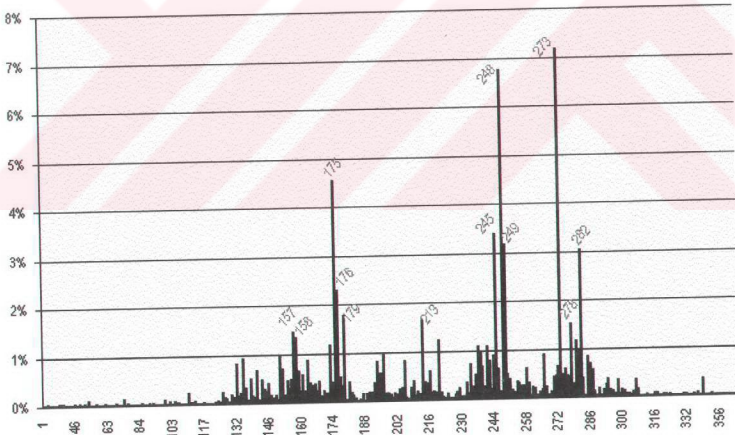
p53'ün katıldığı fizyolojik olayların araştırılması ve tanımlanmasında p53 knock-out (kapatılmış) fareler çok önemli birer model sistemdir. Yapılan çalışmalarda p53 içermeyen farelerin çoğu, birkaç istisna dışında normal gelişimlerini tamamladığı buna karşın erişkin yaşa geldiklerinde tümör gelişimine büyük bir yatkınlığın gözlediği saptanmıştır (31).

1.4.1. p53 Geninin Mutasyonel Analizi

İnsan kanserlerindeki tüm dominant onkogenler ve resesif tümör baskılayıcı genler içinde p53 geni en sık mutasyona uğrayandır. Tüm insan kanserlerinin yarısından fazlasında bu gen mutasyonlarına rastlanmaktadır. Yapılan çalışmalar ile kanser gelişim sürecinde önemli bir rol oynayan bu genin yapısının ve işlevinin mutasyonlardan nasıl etkilendiği belirlenmiştir.

p53'ün inaktivasyonuna neden olan mutasyonlar onun büyüme baskılayıcı fonksiyonunu kaybetmesine neden olmaktadır. Böylece preneoplastik ve neoplastik hücrelerin klonal yayılımı için seçici bir avantaj sağlanmaktadır. İşlevsel p53 genlerinden yoksun transgenik fareler normal gelişirler fakat istisnasız 3-6 aylarda kanser gelişimi gözlenir (31). Çoğu mutant p53 normal biyolojik aktivitesini yerine getirememektedir. Bu da, p53'ün tümör gelişiminin baskılanmasındaki gerekliliğini ortaya koyar.

p53’de meydana gelen missens mutasyonların %90’dan fazlası dizi spesifik DNA bağlama bölgesini içermektedir (32). Bu bölge 102 ve 292.amino asitler arasında lokalizedir. Çeşitli türler arasında yüksek oranda korunmuş beş domenden dördü bu bölgededir. Mutasyonların %79’u bu korunmuş domenlerde gözlenmektedir. Bu domenler p53’ün fonksiyonunda temel rol alan amino asitleri içermektedir. Domen I, 13-19; domen II, 117-142; domen III, 171-181; domen IV, 234-258; domen V, 270-286. amino asitler arasında yerleşim gösterir. Missens mutasyonlarının %40’dan fazlası R175, G245, R248, R249,R273 ve R282 kodonlarında görülmektedir (şekil 1.5). Bunlar altı “hotspot” mutasyonları oluşturmaktadır. Bu amino asitlerden R248 ve R273 DNA ile direkt etkileşim gösterirler. Bunlarda meydana gelen mutasyonlar p53’ün transkripsiyon faktörü olarak rol oynama yeteneğini kaybetmesine neden olmaktadır. Diğer dört hotspot kodon ise p53’ün DNA ile etkileşimi için gerekli olan konformasyonun korunmasını sağlamaktadır (25).



Şekil 1.5. p53 kodon mutasyonlarının dağılımı (10, 27).

p53 proteininin amino ve karboksi terminalindeki missens mutasyon oranı düşüktür (%23). Burada nonmissens mutasyonlar (nonsens, çerçeve kayması, kırılma ve sessiz mutasyonlar) daha sıktır. Amino ve karboksi terminalinde missens mutasyonların nadir olması, bu bölgelerde tek bir amino asidin doğruluğunun konformasyon ya da fonksiyonu için temel olmadığını düşündürmektedir (27). Domen I'de de bu güne kadar mutasyon bulunamamıştır. Ekzon 5-8 içindeki korunmuş dizilerde missens mutasyonları düşük bir oranda gözlenmektedir

p53'ün üreme hücre mutasyonları belirli bazı kanser tiplerine kalıtsal yatkınlıkta rol oynamaktadır (33). Çok ender bir durum olan Li-Fraumeni sendromunda 30'lu yaşların erken döneminde bir dizi kansere yatkınlık gösteren aile üyeleri bir p53 allelinde nonsens ya da missens mutasyonlar taşımaktadır. Etkilenmemiş aile üyelerinin hücreleri herhangi bir mutasyon göstermemektedir. Tek bir mutasyonun kalıtımı normal gelişmeye izin verir, diğer taraftan p53'ün bu heterozigotluğunun kaybı için tek bir somatik mutasyonun yeterli oluşu kanser riskini oldukça arttırmaktadır. İnsan tümörlerinde gözlenen p53 gen mutasyonlarının büyük bir çoğunluğu (>%98) somatik olarak kazanılmış mutasyonlarla açıklanmaktadır (34).

Ekzojen karsinojenler ve endojen biyolojik süreçler mutasyon nedeni olarak bilinmektedir. İnsan kanserlerinde spontan olarak meydana gelen nokta mutasyonların önemli kaynakları arasında: DNA polimerazın doğruluğu, depürinasyon (pürin gruplarının kaybı), biyolojik olaylar ile ortaya çıkan serbest radikallerin oksidatif zararı ve 5-metil sitozinlerin deaminasyonu sayılabilir (34).

p53 genindeki mutasyonlar çoğu durumda tümöre spesifiktir (35). Örneğin kolorektal karsinoma, beyin tümörleri, lösemi ve lenfomalarda CpG dinükleotidlerinde transisyon mutasyonları çok yüksektir. Akciğer, karaciğer, göğüs kanserleri ve baş ve boyun karsinomalarında G→T transversiyonuna daha sık rastlanmaktadır. Deri kanserlerinde çoğunlukla dipirimidin dizilerinde transisyonları ve mesane kanserlerinde ise G→C transversiyonları oldukça sık gözlenirken diğer kanserlerde daha nadir görülmektedir. Hücre tipinde ve farklı dokularda metabolik ve DNA tamir kapasitesindeki farklılıklar bu çeşitliliğinin temelini oluşturan faktörler olarak görülmektedir (34).

p53'de meydana gelen bazı spesifik mutasyonlar spesifik karsinojenler ile ilişkilidir (Tablo 1.6) (36). Spesifik mutasyonlar hayvan model sistemlerinde bir karsinojen ile oluşturulabilmiştir. Bir küf toksini olan aflatoksin ile kontamine yiyeceklerin yüksek oranlarda gözleendiği ülkelerde karaciğer kanserlerin gelişim riski oldukça yüksek bulunmuştur. Bu hastalarda p53 geni kodon 249'daki G→T transversiyonu karakteristiktir. Deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar UV irradyasyonun deri kanserine neden olduğunu göstermiştir. Bu tümörlerde p53'deki sık gözlenen baz değişimleri C→T transisyonları ya da CC→TT çift transisyon mutasyonlarıdır. Ayrıca sigara içimi akciğer kanserlerinde olduğu kadar baş ve boyun kanserlerinde de güçlü bir risk faktörüdür. Küçük olmayan hücreli akciğer kanserlerinde ve baş-boyun kanserlerinde p53 mutasyonları GC→TA transversiyonlarında bir artış gözlenmektedir. Sigaradaki bazı karsinojenler, örneğin benzo(a)piren insan hücrelerinde bu tip baz değişimlerine neden olmaktadır.

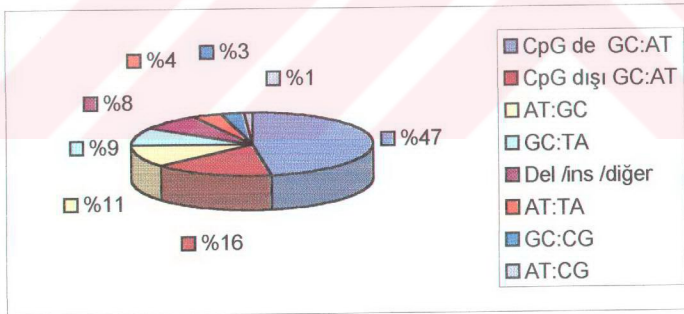
Tablo 1.6. Farklı kanserlerde gözlenen spesifik p53 mutasyonları (34,36).

Tümör Tipi	Karsinojenik Etki	Mutasyon Tipi
Hepatosellüler karsinoma	Aflatoksin B1	AGG→AGT (kodon 249, Ser)
Deri karsinoma	Güneş ışığı (UV)	CC→TT
Çeşitli	Vinil klorid	A:T→T:A
Akciğer karsinoma	Tütün içimi	G:C→T:A

1.4.2. Kolon Kanserlerinde p53 Gen Mutasyonları

Kolorektal kanserlerde 17p allelik kayıplarına oldukça sık rastlanılmaktadır. Özellikle karsinomalarda bu oran %75'dir (37). Kaybolan bu bölgenin p53 tümör baskılayıcı genini içerdiği yapılan detaylı çalışmalarla ortaya konmuştur (38). Kolon tümörlerinde p53 genine yönelik incelemeler geriye kalan yabani p53 allelinde mutant olduğunu göstermiştir. Daha sonraki çalışmalar ile p53 allellerinin birinde mutasyon meydana geldiğinde, bunu hızlı bir şekilde diğer allelin kaybının takip ettiği belirlenmiştir (39). Bu şekilde mutasyon ve allelik kayıplar p53 tümör baskılayıcı geninin inaktivasyonuna neden olmaktadır. p53 heterozigotluğunun kaybı kolorektal tümör gelişiminin geç döneminde, çoğunlukla adenomadan karsinomaya geçiş sırasında meydana gelmektedir (15,37).

Kolon tümörlerindeki p53 mutasyonlarının büyük bir kısmı G:C→A:T transisyonları oluşturmaktadır (Şekil 1.6). Bunların çoğu CpG dinükleotidlerinde meydana gelmektedir. Kolon tümör transisyon mutasyonlarının yarıdan fazlası domen 3↔5'de, üç CpG hotspot'da (kodon 175, 248 ve 273) görülmektedir (10, 27,32, 34).



Şekil 1.6. Kolon kanserlerindeki p53 geni mutasyon dağılımı (10,27,34).

1.5. KOLON KANSERLERİNDE K-RAS VE p53 GEN DEĞİŞİMLERİNİN KLİNİK ÖNEMİ

Kolon kanserleri genetik mekanizması en iyi tanımlanmış kanserlerden biridir. Moleküler temellerin bilinmesi hastalığın kliniği açısından önemli ipuçları vermektedir. Bu değişimler hastalığın erken tanısının konması, prognozu ve tedavinin etkinliğinde önemli bir role sahiptir.

Kolon kanserlerindeki gen değişimlerinin moleküler karakterizasyonu yapılarak spontan kanserin henüz erken evresinde tanı konabilecektir. Özellikle dışkı (40) ve serumdan (41) DNA elde edilerek k-ras ve p53 gen mutasyonlarının saptanması çalışmaları ümit vericidir.

Kanserli hastaların serumlarında p53 antikorlarının varlığının gösterilmesini temel alan yeni teşhis stratejileri geliştirilmiştir. p53 proteinine karşı serum antikorları göğüs, akciğer ve lenfo-retiküler kanserli hastaların yaklaşık olarak %20' sinde bulunmuştur (10). Kolon kanserli hastalarda p53 geni değişimleri ve artmış serum p53 antikor düzeyi arasında da anlamlı bir ilişki bulunmaktadır (42). Ayrıca bu antikorlardan nüks ve kanser aşularının geliştirilmesi çalışmalarında da faydalanılmaktadır.

Mutant p53 ve ras'ın *in vitro* hücre dizilerini onkojenik transformasyona sürüklediği bilinmekte ve bunun *in vivo* olarak anlamlı bir etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir (43). K-ras ve p53 düzensizliklerinin bir arada görüldüğü hastalar değerlendirildiğinde, bu hastaların sağ kalım süresinin, tek bir değişimi taşıyan hastalara oranla yarı yarıya azaldığı gösterilmiştir (44). p53 değişimleri tek başına bir prognoz faktör olarak değerlendirildiği gibi tedaviye dirençten de sorumlu tutulmaktadır (45).

Kolon kanserlerinin moleküler genetiğinin anlaşılması gen tedavisi uygulamalarına da hız kazandırmıştır. p53 hasarlı kolon kanserli hücrelere doğal p53 geninin sokulması tümör hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır (46). Bu tedavinin *in vitro* ve *in vivo* uygulamaları bulunmaktadır (47). Ayrıca aşırı üretilen K-ras onkogenini hedef alan antisense (onkogen RNA'ya spesifik) oligonükleotid ile protein üretim kapasitesi azaltılabilmektedir (48).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. KULLANILAN ALETLER

Agaroz Jel Elektroforez Düzeneđi, ATTO (Japonya)
UV Kaynağı, Vilberr Lourmat (Fransa)
Kamera, Polaroid MP-4 (ABD)
Otomatik Mikropipetler, Gilson (Fransa)
Blender 8011 Model 32BL80, Dynamic Cor. of America (ABD)
Sođutmalı Santrifüj IEC, MP4R (ABD)
pH Metre, WTW (Almanya)
Manyetik Karıştırıcı, Elektro-Mag (Türkiye)
Hassas Terazi, Mettler AT261 (İsviçre)
Hassas Terazi, Mettler PJ6000 (İsviçre)
Mikrosantrifüj, IEC Micro-MB (ABD)
Mikrosantrifüj, Heraeus Biofuge® B (Almanya)
Etüv, Heraeus (Almanya)
Laminar Flow, Özge A.Ş. (Türkiye)
Otoklav, All American (ABD)
Pastör Etüv, Elektro-Mag (Türkiye)
Spektrofotometre, Unicam 8625 (İngiltere)
Kırk Buz Makinası, Scotsman (ABD)
Buzdolabı, Arçelik (Türkiye)
Derin Dondurucu -20°C, Philco (Türkiye)
Isısız Döngü Cihazı, Biometra (ABD)
Su Banyosu, GFL 1083 (Almanya)
Vakumlu Mikrofüj, Savant (İngiltere)
Vorteks, Elektro-Mag (Türkiye)
DNA Dizi Analizi Sistemi, IBI (ABD)

2.2. Kimyasal Maddeler

Etanol, fenol, üre, akrilamid ve isopropanol *Merck (Almanya)*; otoradyogram filmi ve film banyo solüsyonları *Kodak (ABD)*; polaroid film 667 *Polaroid (ABD)*; agaroz, 100bp DNA belirteç, Mavi/Turuncu 6XYükleme boyası, proteinaz K, Taq polimeraz, *OmniBase™ DNA Cycle Sequencing sistem, OmniBase™ Sequencing enzim karışımı ve primerler Promega (ABD)*; radyoaktif madde (α -³⁵SdATP) *Amersham (İngiltere)* ve bunların dışında kullanılan diğer tüm kimyasallar *Sigma (ABD)*'den satın alınmıştır.

2.3. Primerler

<u>Gen</u>	: K-ras
<u>Primer kodu ve yönü</u>	: MA1 (ileri), MA2 (geri)
<u>Ürün</u>	: 107 bç
<u>Nükleotid dizisi</u>	: MA1 : 5'.. GACTGAATATAAACTTGTGG..3' MA2 : 5'.. CTATTGTTGGATCATATTCG.. 3'
<u>Gen</u>	: p53
<u>Primer kodu ve yönü</u>	: MBA1 (ileri) ,MBA2 (geri)
<u>Ürün</u>	: 1136 bç
<u>Primer kodu ve yönü</u>	: MBA3 (ileri), MBA2 (geri)
<u>Ürün</u>	: 149 bç
<u>Nükleotid dizisi</u>	: MBA1 : 5'..TGTTCACTTGTGCCCTGACT.. 3' MBA2 : 5'..CCAGTGTGCAGGGTGGCAAG. 3' MBA3 : 5'..TCTCCTAGGTTGGCTCTGAC.. 3'

2.4. Kimyasal Çözeltiler

2.4.1. DNA İzolasyonu

<u>Homojenizasyon Solüsyonu</u>	: 10mM NaOH
	10mM Tris HCl (pH 8.0)
	25mM EDTA (pH 8.0)
	%0.5 SDS
	0.1mg/ml Proteinaz K

TE Tamponu : 10mM Tris-HCl (pH 7.4)
1mM EDTA (pH 8.0)

2.4.2. PZR

10XReaksiyon Tamponu : 500mM KCl
100mM Tris-HCl (pH 9.0)
%1 Triton® X-100

25mM dNTPs : 100mM nükleotidlerden (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) eşit miktarda karıştırılarak hazırlandı.

2.4.3. Agaroz Jel Elektrofrezisi

10XTBE : 89mM Tris baz
89mM Borik asit
2mM EDTA

Mavi/Turuncu 6X Yükleme Boyası :

%10 Fikol® 400
%0.25 Bromofenol mavisi
%0.25 Ksilen siyanol
%0.4 Turuncu G
10mM Tris-HCl (pH 7.5)
50mM EDTA

2.4.4. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

Kit : Wizard® PCR Preps DNA Saflaştırma Sistemi

- * PCR Preps DNA Saflaştırma Resini.....(50ml)
- * Wizard™ PCR Preps Minikolonlar.....(50 adet)
- * Wizard™ PCR Direkt Saflaştırma Tamponu.....(5ml)

- 50mM KCl
- 10mM Tris-HCl (pH 8.8)
- 1.5mM MgCl₂
- %0.1 Triton® X-100

2.4.5. Dizi Analizi Reaksiyonu

Kit : OmniBase™ DNA Cycle Sequencing Sistem ve OmniBase™ Sequencing Enzim Karışımı

- * OmniBase™ d/ddG Nükleotid Karışımı.....(40µl)
0.3µM ddG; diğer tüm komponentlerden 20 µM, 7-deaza dGTP içerir.
- * OmniBase™ d/ddA Nükleotid Karışımı.....(40µl)
0.2µM ddA; diğer tüm komponentlerden 20 µM, 7-deaza dGTP içerir.
- * OmniBase™ d/ddT Nükleotid Karışımı.....(40µl)
0.25 µM ddT ;diğer tüm komponentlerden 20µM, 7-deaza dGTP içerir.
- * OmniBase™ d/ddC Nükleotid Karışımı.....(40µl)
0.25µM ddT ;diğer tüm komponentlerden 20 µM, 7-deaza dGTP içerir.
- * DNA Sequencing 5X Buffer.....(200µl)
250mM Tris-HCl (pH 9.0)
10mM MgCl₂
- * DNA Sequencing Durdurma Solüsyonu.....(300µl)
10mM NaOH
%95 formamid
%0.05 bromofenol mavisi
%0.05 ksilen siyanol
- * OmniBase™ Sequencing Enzyme Karışımı.....200 ünite
10u/µl

2.4.6. Dizi Analizi Jeli

%40 Akrilamid Stok : 380g/l akrilamid ve 20g/l bisakrilamid manyetik karıştırıcı kullanılarak ddH₂O'da çözüldü. Son hacim 1 litreye ddH₂O ile tamamlandı. Whatman 3MM filtre kağıdından geçirildikten sonra karanlıkta, 4° C' de muhafaza edildi.

Instajel : (%6 Poliakrilamid)

75 ml %40 Akrilamid stok

250g Üre

50ml 10XTBE

Toplam hacim 500ml'ye ddH₂O ile tamamlandı.

Karanlıkta, oda ısısında muhafaza edildi.

2.4.7. Otoradyografi**Film Banyo Solüsyonları****Devoloper (Geliştirici) :** Geliştirici : Su (1 : 3)**Fixer (Sabitleştirici) :** Sabitleştirici : Su (1 : 3)**2.5. YÖNTEMLER****2.5.1. KOLON DOKULARINDAN DNA'NIN İZOLASYONU**

Çalışmada kullanılan dokular Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü Genel Cerrahi Anabilim Dalından temin edilmiştir. Kolon kanserli hastaların normal ve tümörlü kolon dokuları alınarak serum fizyolojik sıvı içinde -20°C'de çalışmaya girinceye kadar saklandı.

Normal (N) ve tümörlü (T) dokular hastalara göre kodlanmış ve her iki dokudan da yaklaşık 350-500mg çalışmaya alınmıştır. İlk olarak; doku makasla daha küçük parçalara ayrılıp, üzerine 10ml homojenizasyon solüsyonu ilave edilerek; blender ile homojenize edildi. Bu işlem sırasında aşırı köpürmeyi engellemek amacıyla SDS ve proteinaz-K sonradan peletin içine eklendi. Homojenat 2000 rpm'de 2 dakika çevrilerek elde edilen pelet, 5ml sıvıyla birlikte işleme alındı. Tüp içine 75µl, %10 SDS ve proteinaz-K (0.1 mg/ml) ilave edildi. 55°C'de 30 dakika inkübasyon yapıldı. Her 5 dakikada bir tüpler çalkalandı. İnkübasyon sonrasında eşit hacimde fenol/kloroform/isoamilalkol (25:24:1) eklenerek iyice karışması sağlandı. Ardından 4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüp içine aktarılarak tekrar eş hacimde fenol/kloroform/isoamilalkol (25:24:1) ilave edilip; 4°C'de 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Yeni bir tüpe aktarılan üst faz üzerine, orijinal hacmin iki katı %100 etanol ve yarısı kadar 7.5M amonyum asetat ilave edilerek; tüp

ters yüz edildi. Bu aşamada DNA görünür hale gelmektedir. DNA'nın daha iyi bir şekilde pelet halinde çökmesi için 4°C'de 4000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı fazı atılarak DNA peleti üzerine %70 etanolden 200µl kondu ve iyice yıkanması sağlandı. Pelet, ependorf tüp içine aktarılarak vakumlu mikrofüj aletinde alkol uçuruldu. Daha sonra örnek tüpleri içine 100µl TE solüsyonu ilave edilerek; DNA peletinin çözülmesi sağlandı. Bu tüpler kullanılana kadar 4°C'de muhafaza edildi(49).

Elde edilen DNA'nın saflığını ve konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçümleri yapıldı.

2.5.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) belirli bir DNA bölgesinin milyonlarca kez kopyalarının oluşturulmasını sağlayan bir yöntemdir. DNA'nın yüksek ısı ile tek iplikli hale getirilmesini takiben özel olarak hazırlanan oligonükleotid primerlerin kalıp DNA ile eşleşmesi ve DNA polimeraz tarafından sentezin gerçekleştirilmesi temel prensibini oluşturur (50, 51).

PZR bir döngü sistemidir. Bir döngüde üç basamak yer alır. İlk olarak çift iplikli DNA'nın 94°C'de tek iplikli forma dönüşümü sağlanır. Ardından özel olarak hazırlanan 17-35 nükleotid uzunluğundaki primerler DNA üzerindeki komplementer bölgelere bağlanır. Primerleri oluşturan bazlar temel alınarak bulunan Tm değerine göre bu ısı belirlenir. Bu işlem genellikle 37-55°C arasında gerçekleşir. Son olarak Taq DNA polimeraz 72°C'de 5'→3' yönünde primere uygun nükleotidleri takar. Bu şekilde bir döngü tamamlanır ve 22 döngü sonunda yaklaşık olarak bir milyon kopya üretilmiş olur.

PZR'da kullanılan *Taq* polimeraz termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan izole edilmiştir (52). Isıya dirençli olması onun kullanımındaki en büyük avantajı oluşturur. Bunun yanı sıra 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahip olmaması nedeniyle hata yapma olasılığı (1/10⁶) vardır. Bu oran direkt olarak reaksiyon şartlarının uygunluğundan etkilenir. Özellikle primer, dNTP ve MgCl₂ konsantrasyonu ile reaksiyona girişteki DNA miktarı reaksiyonun etkinliği ve doğruluğunu direkt olarak etkiler.

Bu yöntem ile k-ras ve p53 genlerinin ilgili bölgelerinin çoğaltılması amaçlandı. Normal ve tümörlü dokulardan izole edilen DNA'lar ayrı ayrı reaksiyona sokuldu. Örnekler: 0.1-1µg kalıp DNA, 1XPZR tamponu, 25pmol P (ileri) ve P (geri)

primerler, 200 µM dNTP karışımı, 1.5mM MgCl₂ ve 1 ünite Taq polimeraz içerecek şekilde toplam 50µl'lik hacime dH₂O ile tamamlanarak hazırlandı. Bu işlem 0.5ml ependorf tüplerde ve buz üzerinde gerçekleştirildi. Tüplerin üzeri, döngüdeki yüksek ısı sırasında buharlaşmayı önlemek amacı ile iki damla mineral yağı ile kapatıldı. Kısa bir santrifüj sonrası tüpler ısısal döngü cihazına yerleştirilerek belirlenen programlar uygulandı.

***K-ras* için PZR döngü programı:**

95°C'de 5 dakika ön denatürasyon

94°C'de 1 dakika.....(denatürasyon)

55°C'de 2 dakika.....(eşleşme)

72°C'de 1 dakika.....(sentez)

72°C'de 6 dakika final uzaması ile reaksiyon tamamlanır. Toplam 35

döngü uygulanmıştır.

***p53* için PZR döngü programı:**

95°C'de 5 dakika ön denatürasyon

94°C'de 1 dakika.....(denatürasyon)

58°C'de 1 dakika.....(eşleşme)

72°C'de 1 dakika.....(sentez)

72°C'de 6 dakika final uzaması ile reaksiyon tamamlanır. Toplam 35

döngü uygulanmıştır. Tüpler daha sonra 4°C'de muhafaza edildi.

2.5.3. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

Agaroz jel elektroforezi DNA parçalarının ayrılması, tanımlanması ve saflaştırılması için kullanılan standart bir methoddur. Agaroz birkaç yüz ile ~ 20 kb aralığındaki DNA parçalarını ayırabilmektedir. Daha küçük DNA parçaları için ise poliakrilamid kullanılır.

Aaj ve Borst 1972'de DNA moleküllerinin göç etme oranlarının moleküler ağırlıklarının logaritmalarına ters orantılı olduğunu göstermişlerdir (54). Çoğunlukla jel elektroforezi bilinen büyüklükteki bir belirteç DNA ile uygulanır. Bu sayede moleküler büyüklüğü bilinmeyen DNA kolayca saptanabilir. Jel elektroforezinin en temel avantajı, DNA bandlarının yüksek duyarlılıkta kolayca gözlenebilmesidir.

Jelde, DNA bantları Etidyum Bromid (EtBr) ile boyanmıştır. Bir bantta DNA'nın 0.05µg'ı dahi jel UV ile aydınlatıldığında görünür floresans olarak saptanabilir.

PZR ile elde edilen ürünlerin doğruluğu ve kalitesinin belirlenmesi için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Elde edilen büyüklükteki ürünleri tanımlayabilmek için %1.2'lik jel kullanıldı. Kullanılan elektroforez düzeneğine uygun 40ml'lik hacim; toz halindeki agarozun 1XTBE tamponunda kaynatılarak çözünmesi ile oluşturuldu. Ardından 55-60°C'ye soğutulurak 0.25µg/ml EtBr ilave edildi. Kuyuları oluşturacak olan tarak, tabağına yerleştirildikten sonra, hazırlanan jel, hava kabarcığı kalmayacak şekilde buraya döküldü. Jelin polimerizasyonu sonrası tarak dikkatlice çıkarılarak 1XTBE tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Bu tampondan jele, üzerini 1-2mm geçecek kadar eklendi. Oluşan kuyulara örnekler, 6X yükleme boyası ile 5:1 oranında karıştırılarak yüklendi. Belirteç DNA ise 1:1 oranında yüklendi. Güç kaynağı açılarak 5-10V/cm olacak şekilde 80V'a ayarlandı. Yaklaşık bir saat sonra güç kaynağı kapatıldı ve jel UV ışını altında incelendikten sonra fotoğrafı çekildi.

2.5.4. DİZİ ANALİZİ

Dizi analizi DNA'nın belirli bir bölgesinin baz dizilerinin saptanmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem moleküler biyolojideki uygulamalarda zirveyi oluşturur (54).

Radyoaktivite içeren polinükleotidler poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıldığında, orijinal DNA'nın nükleotid dizisi jelin bir otoradyografisi ile direkt olarak okunabilir. PZR metodunun ortaya konması ile daha basit ve daha güçlü yeni dizi analizi yöntemleri (cycle sequencing) ortaya konmuştur.

2.5.4.1. PZR ÜRÜNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI

PZR ürünlerinin saflaştırılması Wizard® PCR Preps DNA saflaştırma sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu sistemin avantajı oldukça basit ve hızlı olmasıdır. PZR ürünleri primer-dimer ve amplifikasyon primerlerini içeren kontaminantlardan etkili bir şekilde saflaştırılmıştır.

Resin, kullanılmadan önce homojenizasyon amacı ile 37°C'de 15 dakika bekletilip, iyice çalkalandıktan sonra 30°C'ye kadar soğutuldu. 100µl direkt

saflaştırma tamponundan 1.5ml mikrosantirfuj tüp içine kondu; 45 µl PZR ürünü, yağı silinerek eklendi ve vorteks yapıldı. Üzerine 1ml resin ilave edilerek 1'er dakika ara ile 3 kez kısaca vorteksledi. Kullanılacak olan 3ml'lik şırınganın pistonu çıkarıldıktan sonra minikolona yavaşça takıldı. Hazırlanan karışım şırıngaya pipetlendi ve piston yavaşça yerine takılarak karışımın minikolondan geçmesi sağlandı. Şırınga minikolondan ayrıldı ve pistonu çıkarılarak bu kez 2ml %80 izopropanol ile minikolonun yıkanması sağlandı. Şırınga çıkarıldıktan sonra, minikolon temiz bir 1.5ml mikrosantirfuj tüpüne alındı ve 2 dakika 10000g'de santrifuj edilerek resinin kuruması sağlandı. Minikolon yeni bir mikrosantirfuj tüpüne alınarak içine 50µl ddH₂O kondu ve bir dakika beklendi. Ardından minikolon 20 saniye 10000g'de santrifuj edilerek istenilen ürün saf olarak elde edilmiş oldu. Bu ürünler -20°C'de muhafaza edildi.

2.5.4.2. DİZİ ANALİZİ REAKSİYONU

Sanger metodu (zincir sonlanması, dideoksi veya enzimatik metot) kalıp olarak tek iplikli bir DNA molekülünü kullanır ve bir DNA polimeraz enzimi ile yeni bir DNA ipliğinin sentezini içerir. Yeni olarak sentezlenen bu iplik kalıp ipliğin komplementeridir. Çift iplikli moleküller DNA analizi için kullanılabilir fakat öncelikle bunların tek iplikli forma denatüre edilmesi gerekir. Yeni ipliğin sentezi, kalıba bir oligonükleotidin hibridizasyonu ile başlar. Sanger'in Dizi Analizi Metodu ddNTP'lerin, bilinen dNTP'ler ile aynı yönde büyüyen zincir içine dahil olmasına bağlıdır. Ne var ki ddNTP'lerin dNTP'lerden farkı, zincir uzaması için gerekli olan 3'-OH grubunun eksik olmasıdır. Bir ddNTP yeni ipliğin içine dahil olduğunda, hidroksil grubunun olmaması dNTP ile başarılı bir fosfodiester bağının formasyonunu önler ve zincir uzaması bu noktada sonlanır. Bir reaksiyona DNA polimeraz ile dört ddNTP'den biri ve bilinen dört dNTP doğru oranlarda uygulanmalıdır. ddNTP'nin reaksiyona katılması keyfidir ve çeşitli uzunluklarda polinükleotid zincir popülasyonu oluşturur. Sentez, kalıba oligonükleotid primerin bağlanmasıyla başlar ve her zincir kullanılan ddNTP'ye bağlı olarak spesifik bir bazda sonlanır. Dört farklı reaksiyonda dört farklı ddNTP kullanılır. Bu reaksiyonlarda, orijinal DNA'nın baz kompozisyonuna göre farklı büyüklüklerde polinükleotidler oluşur. Tamamlanan dizi bilgisi bir poliakrilamid jelde, reaksiyon karışımının elektroforezi ile elde edilebilir. Bilinen dizi analizlerinde dNTP'lerden

biri radyoaktivite ile işaretlidir. Genellikle [α -³⁵S]dATP, [α -³²P]dATP veya [α -³³P] dATP kullanılır. Bu şekilde poliakrilamid jelde dört farklı reaksiyonun elektroforezi ile kazanılan bilgi, otoradyografi ile görünür hale getirilebilir.

2.5.4.2.1. CYCLE SEQUENCING

Cycle Sequencing (döngüsel dizi analizi) teknik olarak basit olması yanında oldukça güçlü bir yöntemdir. Sanger'in dideoksi tekniğinin adaptasyonu sonucu oluşmuş yeni bir yöntemdir. Bilinen dizi analizi yöntemlerinden avantajlıdır: Reaksiyon oldukça basittir, daha az kalıp DNA'ya ihtiyaç duyar, kalıp DNA'nın temizliği ve kalitesi çok fazla kritik bir değer taşımaz. Bu metotta kalıp DNA'nın bir bölgesinin amplifikasyonu için tek bir primer kullanılır. Bir ddNTP ve dNTP'lerin bir karışımında taq polimeraz kullanılarak, kalıp DNA'nın bir bölgesinin amplifikasyonu lineer olarak gerçekleştirilir.

Bilinen dideoksi metodundaki gibi, cycle sequencing tek iplikli bir kalıptan yeni bir DNA ipliğinin oluşturulmasını içerir. Sentez primer eşleşmesinin olduğu yerden başlar ve bir ddNTP'nin zincire girmesi ile sonlanır. Buradaki temel fark bu sürecin ısısal döngü cihazının kontrolü altında 20-30 kez tekrarlanabilmesidir. Bu sayede daha az kalıptan daha iyi netice elde edilebildiği gibi çift iplikli bir molekülün denatürasyon süreci bertaraf edilmiş, denatürasyon ısısal döngü cihazında otomatik olarak sağlanmış olmaktadır.

Bu yöntem OmniBase™ DNA Cycle Sequencing sistem kiti ile gerçekleştirildi. Kitin kullanım kılavuzu uygulamada esas alınarak, "direct incorporation" yöntemi kullanıldı.

Bir örnek için 4 adet 0.5ml mikrosantrifüj tüp işaretlenerek (A,C,G,T) hazırlandı. Her tüpe uygun d/ddNTP karışımından 2 şer µl kondu ve kullanılabilecek kadar buz üzerinde bekletildi. Bu arada reaksiyon karışımı hazırlandı.

Örnek reaksiyon:

* Kalıp DNA.....5 µl

Primer (ileri) 1pmol/ µl.....3 µl

[α-³⁵S] dATP 12.5 µci/ µl.....1 µl

DNA Sequencing 5X Tamponu.....5 µl

Nükleazdan arındırılmış su.....2 µl (toplam hacim 16 µl olacak şekilde)

* Saflaştırma işlemi sonucu elde edilen 50 µl 'lik hacmin tamamı, vakumlu mikrofüj cihazı kullanılarak istenilen hacme indirildi.

Bu karışıma OmniBase™ Sequencing enzim karışımından (10ü/ µl)'dan 1 µl ilave edildi. Kısaca pipetleme ile karıştırılarak hazırlanan d/ddNTP karışımlarına 4'er µl eklendi. Tüplerin üzeri iki damla mineral yağı ile kapatılarak kısaca santrifüj edildi. Tüpler ısısal döngü cihazına yerleştirilmeden önce cihaz, 95°C'de bekletilerek tüplerin tamamı yerleştirildikten sonra döngü programı başlatıldı.

Tablo 2.1. Dizi analizinde kullanılan primerler.

Primer	Gen	Hedef kodon
MA2 : 5'.. CTATGTTGGATCATATTCG.. 3'	K-ras	12,13
MBA3 : 5'..TCTCCTAGGTTGGCTCTGAC.. 3'	p53	248, 249
MBA1 : 5'..TGTTCACTTGTGCCCTGACT.. 3'	p53	175

Döngü programı (K-ras ve p53 için aynı program kullanıldı):

95 °C'de 2 dakika ön denatürasyon

95 °C'de 30 saniye.....(denatürasyon)

42 °C'de 30 saniye.....(eşleşme)

70 °C'de 1 dakika.....(sentez)

Toplam 45 döngü uygulandı. Döngü tamamlandıktan sonra tüplere 3'er µl DNA sequencing durdurma solüsyonu, yağ tabakasına girmeden, tüplerin kenarından eklendi. Kısaca santrifüj edilerek, tüpler daha sonra kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

2.5.4.3. DİZİ ANALİZİNDE KULLANILAN JELİN HAZIRLANMASI

Poliakrilamid jeller uzunluğu 1 kb'dan daha az olan DNA parçalarının analizinde kullanılır. Poliakrilamidin yoğunluğu ilgilenilen DNA'nın büyüklüğüne bağlı olarak %3.5 ile %20 arasında değişir. Bu jel, kalınlığı 0.4 mm olan oldukça ince bir jeldir.

Çalışmamızda PZR ile elde ettiğimiz DNA bant aralığı göz önünde bulundurularak, nükleotidlerin etkili bir şekilde ayrılabilceği %6'lık poliakrilamid jel kullanıldı.

Jeli dökeceğimiz cam kaset, üç tarafı ara bantlar ile kapatılmış iki cam tabakanın hazırlanmasıyla oluşturuldu. Sızıntıyı önlemek amacıyla bu üç kenar %0.5'lik agaroz ile kapatıldı ve kaset, kısıpçaklarla sabitlenerek yarım saat beklendi. Hazırladığımız kaset hacmi için yeterli olan 80ml "Instagel" kullanıldı. Normalde bu yapının polimerizasyonu oksijen tarafından engellenmektedir. Bu sebeple "Instagel", kasete dökülmeden hemen önce polimerizasyonu hızlandırıcı %10 APS'dan 400µl ve TEMED'den 40µl ilave edildi. Jelin, 45° lik bir açıyla ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde dökülmesine özen gösterildi. Daha sonra tarak ters olarak yerleştirilerek polimerizasyon için 1.5-2 saat beklendi. Polimerizasyonun ardından tarak dikkatlice çıkarılarak temizlendi ve kuyuları oluşturacak dişli kısmı yavaşça yerleştirildi.

Bu jel, aynı zamanda denatüre edici bir jeldir. Jelin içeriğindeki üre bu özelliği sağlar. Bu sayede çift iplikli DNA yapılarının oluşması önlenir.

2.5.4.4. YÜKSEK VOLTAJ DİZİ ANALİZİ JEL ELEKTROFOREZİ

Hazırlanan jelin polimerize olmasının ardından baz yürütücüye düşey pozisyonda yerleştirilerek, elektroforez işlemine hazır hale getirildi. Dizi Analizi jeline yüksek üre konsantrasyonundan dolayı, ürenin örnek kuyulara yayılma eğilimi vardır. Bu da örneklerin kuyulara yüklenmesini etkileyecektir. Bu sebeple kuyular, örneklerin yüklenmesinden hemen önce, jel tampon çözeltisi ile temizlendi.

Elektroforez sırasında jele uygulanacak yüksek akım veya yüksek voltajın neden olacağı yüksek ısı, jelin erimesine hatta yanmasına sebep olabilir. Bu nedenle güç kaynağı akım gücü (Watt) göz önüne alınarak ayarlanır. Genellikle 1,0-1,1W/cm³

üzerinden hesaplanarak uygulanır. Bu çalışmada jel 55 Watt'da yürütülerek jelin ısı 45-55°C 'de sabit tutulabilmiştir.

Jele örnekler yüklenmeden önce yaklaşık olarak bir saatlik bir ön yürütme yapıldı. Bu sayede jelin sıcaklığının 55-60°C'ye ulaşması sağlandı. Örnekler 2 dakika 90 °C'de denatüre edildikten sonra , kuyulardaki üre temizlenerek 3'er µl yüklendi. Elektroforez işleminin süresi, örneklerle birlikte yüklenen Bromofenol mavisi ve ksilen siyanol gibi belirteç boyalar ile belirlendi. Bu boyalar jelin yoğunluğuna bağlı olarak belirli sayılarda baz çiftleri ile aynı oranda migrasyon gösterirler.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra cam kasetin ara bantları dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Camlar birbirinden ayrılırken jelin bir tarafta kalmasına özen gösterildi. Jel Whatman 3MM filtre kağıdı üzerine alındıktan sonra sera ile kaplandı ve 80°C'ye ayarlanan etüvde kurutuldu.

2.5.5. OTORADYOGRAFI

Otoradyografi, radyoaktivite içeren DNA parçalarının görünür hale getirilmesidir. Bu sayede elektroforez işlemi ile ayrılan DNA bantlarının lokalizasyonu belirlenir (50).

Dizi Analizi jeli kuruduktan sonra, üzerindeki sera çıkarılarak, film kasetine yerleştirildi. Bu kasete karanlık odada otoradyogram filmi konarak kapatıldı. İki-üç gün oda ısısında bekletildikten sonra, kaset karanlık odada açılarak, sırasıyla geliştirici, su ve sabitleştiriciden geçirildi. Film kurutulduktan sonra değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. DNA İzolasyonu Sonuçları

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü Genel Cerrahi Anabilim Dalından sağlanan toplam 18 doku örneği alfabetik olarak kodlanmış ve normal (N) ve tümörlü (T) olarak gruplandırılmıştır.

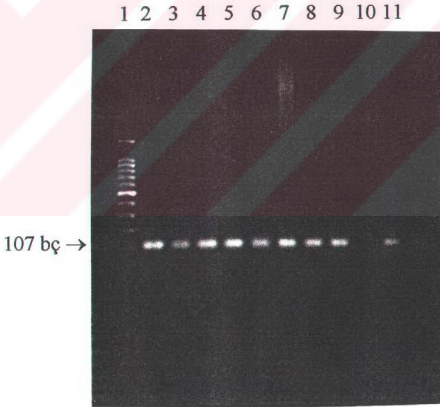
Normal ve tümörlü kolon dokularından elde edilen DNA'nın saflığı ve konsantrasyonunu belirlemek amacı ile spektrofotometrede 260 ve 280nm dalga boylarında ölçümleri yapıldı. Tablo 3.1'de bu ölçümlerin toplu sonuçları verilmiştir. Bu aşamadan sonra gerçekleştirilecek olan PZR'nun etkinliği izolasyon kalitesi ile doğrudan ilişkili olduğundan elde edilen DNA'lar %0.8'lik agaroz jel elektroforezi ile de kontrol edilmiştir.

Tablo 3.1. Normal ve tümörlü dokulardan elde edilen DNA miktarının kantitatif sonuçları.

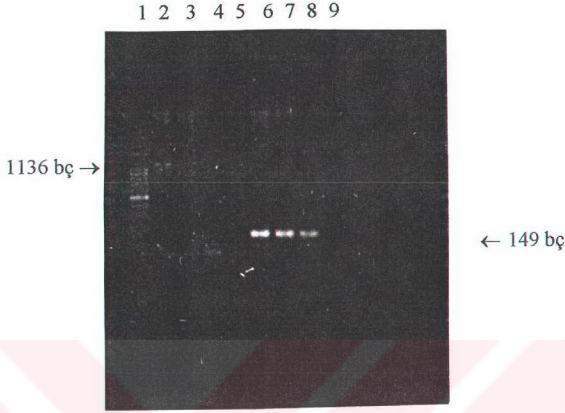
Örnek	A260(nm)	A280(nm)	A260/280	DNA miktarı (µg/ml)
1. AN	0,028	0,014	2	1400
2. AT	0,007	0,003	2,3	350
3. BN	0,055	0,032	1,7	2750
4. BT	0,015	0,009	1,7	750
5. CN	0,052	0,027	1,9	2600
6. CT	0,095	0,05	1,9	4750
7. DN	0,092	0,044	2,1	4600
8. DT	0,049	0,025	2,0	2450
9. EN	0,041	0,021	2,0	2050
10. ET	0,049	0,03	1,6	2450
11. FN	0,085	0,046	1,8	4250
12. FT	0,106	0,057	1,9	5300
13. GN	0,044	0,019	2,3	2200
14. GT	0,065	0,04	1,6	3250
15. HN	0,055	0,031	1,8	2750
16. HT	0,131	0,07	1,9	6550
17. IN	0,093	0,053	1,8	4650
18. IT	0,07	0,037	1,9	3500

3.2. PZR Sonuçları

Çalışmaya alınan 9 normal ve 9 tümörlü kolon doku örneklerinin tümü DNA izolasyonu sonrası K-ras ve p53 genlerinin ilgili bölgelerinin amplifikasyonu için PZR'nuna sokulmuştur. K-ras geni kodon 12 ve 13'ü içeren ekzon 1 bölgesi MA1 ve MA2 primerleri kullanılarak çoğaltılmış ve 107 bç'lik ürün elde edilmiştir (Şekil 3.1). Diğer taraftan p53 geni kodon 248 ve 249'un bulunduğu ekzon 7 bölgesi MBA2 ve MBA3 primerleri ile çoğaltılarak 149 bç'lik ürün, kodon 175'i içeren ekzon 5 bölgesi ise MBA1 ve MBA2 primerleri ile çoğaltılarak 1136 bç'lik ürün elde edilmiştir (Şekil 3.2). %1.2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilen PZR ürünlerinden 107 ve 149 bç'lik küçük bölge amplifikasyonlarının, 1136 bç'lik büyük bölge amplifikasyonundan daha verimli olduğu saptandı.



Şekil 3.1. K-ras geni 107 bç'lik amplifikasyon ürünleri. Marker (M) olarak 100-1000 ve 1500 bç'lik λ faj DNA kullanıldı. Yükleme sıra ile 1. M, 2.DN, 3.DT, 4.EN, 5.ET, 6.GN, 7.GT, 8.IN, 9.IT, 10.-C (negatif), 11.+C (pozitif kontrol) şeklinde yapılmıştır.



Şekil 3.2. p53 geni 1136 ve 149 bç'lik amplifikasyon ürünleri. Yükleme sırası: 1.M, 2.DN, 3.DT, 4.+C, 5.-C (1136); 6.DN, 7.DT, 8.+C, 9.-C (149 bç).

3.3. Saflaştırma Sonuçları

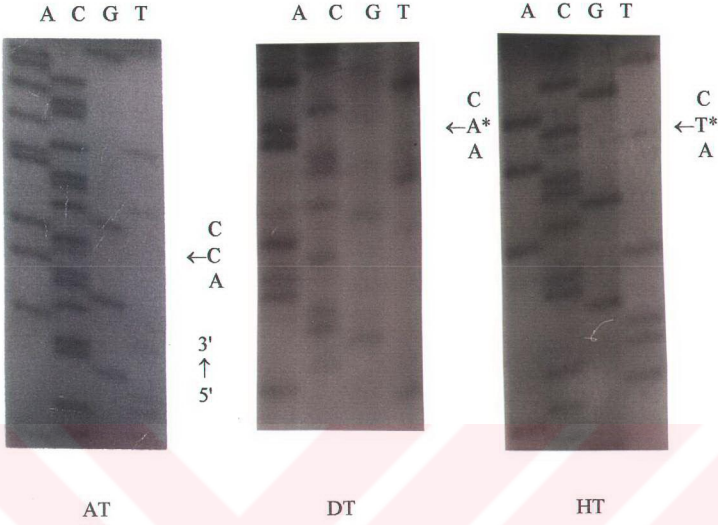
PZR ile çoğaltılan ürünler dizi analizi reaksiyonuna sokulmadan önce Wizard® PCR Preps DNA saflaştırma sistemi ile gerek primer-dimer ve gerekse amplifikasyon primerleri içeren fazlalıklardan arındırılmıştır. Saflaştırma işleminin etkinliği %2'lik agaroz jelde incelenmiş, gerek jeldeki görüntünün tatmin edici olması ve gerekse saflaştırılan ürünün tamamının dizi analizi reaksiyonuna sokulması gerektiğinden, ürün kaybetmemek amacı ile tüm örnekler bu işleme tabi tutulmamıştır.

3.4. Otoradyografi Sonuçları

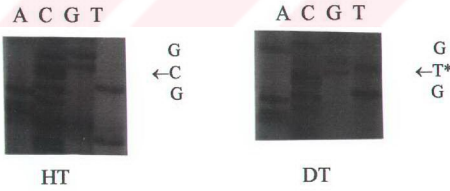
Dizi analizi reaksiyonu sonucu oluşan bantlar %6'lık denatüre edici poliakrilamid jelde ayrılmış, DNA dizileri otoradyogramlardan okunmuştur.

Çalışmaya alınan 9 kolon kanserli doku örneğinin tümünde K-ras kodon 12 ve 13 mutasyonları incelenmiştir. Bunlardan DT örneğinde kodon 12 $\text{GGT}(\text{Gly}) \rightarrow \text{GTT}(\text{Val})$, HT örneğinde ise kodon 12 $\text{GGT}(\text{Gly}) \rightarrow \text{GAT}(\text{Asp})$ missens mutasyonu saptanmıştır (Şekil 3.3). Bu örneklerde kodon 13 mutasyonlarına rastlanmamıştır. Mutasyon saptadığımız DT örneğinin normal dokusu (DN) dizi analizi reaksiyonuna sokulmuş ve herhangi bir mutasyon gözlenmemiştir.

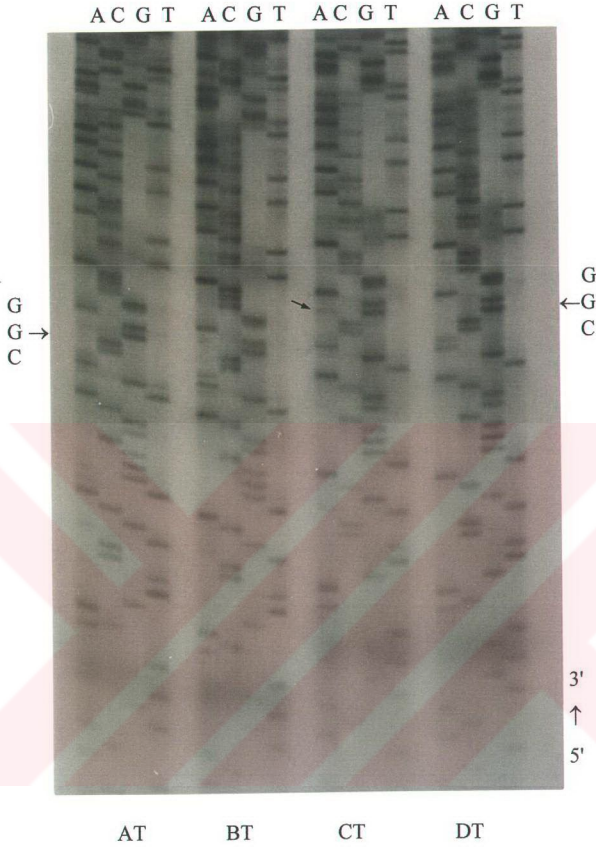
Bu 9 hastadan biri, eksik patolojik bilgisi nedeni ile p53 mutasyon analizlerinin dışında bırakılmıştır. Geriye kalan 8 örnek içinden CT'de kodon 248 $\text{CGG}(\text{Arg}) \rightarrow \text{CAG}(\text{Gln})$ G:A transisyonu tesbit edilirken diğer örneklerde bu mutasyona rastlanılmamıştır (Şekil 3.4). İncelenen ekzon 7 bölgesinde, kodon 249 dahil herhangi bir mutasyon gözlenmemiştir. Ekzon 5 bölgesindeki kodon 175 mutasyon analizinde, K-ras kodon 12 mutasyonlarını taşıyan iki örnek (DT, HT) incelemeye alınmış, bu örneklerden DT'de kodon 175 $\text{CGC}(\text{Arg}) \rightarrow \text{CAC}(\text{His})$, G:A transisyonu saptanmıştır (Şekil 3.5). Elde edilen bulgular tablo 3.2'de özetlenmiştir.



Şekil 3.3. K-ras kodon 12 mutasyonlarını gösteren dizi analizi otoradyografi örnekleri. AT örneğinde normal (CCA), DT (CAA) ve HT (CTA) örneklerinde mutant kodon 12 gösterilmiştir.



Şekil 3.5. p53 kodon 175 mutasyonunu gösteren dizi analizi otoradyografi örneği. HT örneğinde normal (GCG), DT örneğinde mutant (GTG) kodon 175 gösterilmiştir.



Şekil 3.4. p53 geni kodon 248 mutasyonunun araştırıldığı dizi analizi otoradyografisi örneği. AT, BT ve DT örneklerinde normal (CGG), CT örneğinde ise mutant (CAG) kodon 248 gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Örneklerde saptanan K-ras ve p53 gen mutasyonları.

Örnek	Mutasyonlu gen/genler	Kodon	Nükleotid mutasyonu	Amino asit değişimi
AT	-			
BT	-			
CT	p53	248	CGG→CAG	Arg→Gln
DT	K-ras	12	GGT→GTT	Gly→Val
	p53	175	CGC→CAC	Arg→His
ET	-			
FT	-			
GT	-			
HT	K-ras	12	GGT→GAT	Gly→Asp
IT	-			

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kolorektal kanserler birçok genetik değişimin birikimi ile uzun bir gelişim süreci sonucu ortaya çıkmaktadır. Tek bir hücreden başlayıp yarım düzine genetik kaza sonucu, normal kolon mukozası karsinomaya ilerlemektedir. Bu ilerleme sürecinde rol alan K-ras onkogen ve p53 tümör baskılayıcı gen mutasyonlarının belirlenmesi erken tanı, prognoz ve tedavide önemli birer moleküler belirteç olarak kullanılmasını sağlayacaktır. Kolorektal kanserlerin halen ABD’de kansere bağlı ölüm nedeni olarak ikinci sırada yer alması bu alanda yapılan çalışmaların önemini gözler önüne sermektedir.

Kolorektal tümörlerde K-ras kodon 12, 13 ve 61 mutasyonları, 1cm’den küçük adenomlarda %9, 1cm’den büyük adenomlarda %58 ve karsinomalarda %47 oranında gözlenmektedir (17, 18, 21). Bu gendeki kodon 12 mutasyonu en sık rastlanılan mutant formu oluşturmakta ve her zaman bir missens mutasyon olarak görülmektedir. Çalışmaya alınan 9 örneğin 2’sinde (%22.2) saptanılan mutasyondan biri GGT (Gln)→GTT (Val), diğeri GGT (Gln) →GAT (Asp) missens mutasyonu idi. Dolayısı ile saptanılan mutasyonlar literatür bilgilerine uymaktadır.

Kolorektal tümörlerde p53 gen mutasyonlarının görülme sıklığı özellikle karsinomalarda %75’lere ulaşmaktadır (27, 32, 34). Mutasyonların büyük bir kısmı CpG dinükleotidlerinde görülen G:C-A:T transisyonlarından oluşmaktadır. Kolon tümör transisyon mutasyonlarının yarıdan fazlası ekzon 5-8 arasındaki üç kodonda (kodon 175, 248 ve 273) yoğunlaşmaktadır. Yapılan bu çalışmada kodon 175 ve 248’deki nokta mutasyonları incelenmiş, toplam 8 örneğin 2’sinde (%25) mutasyon gözlenmiştir. Kodon 248 mutasyonunun incelendiği 8 örneğin birinde (CT) CGG (Arg)→CAG (Gln) mutasyonu saptanmıştır. K-ras mutasyonu saptanan 2 örnekte kodon 175 mutasyonu incelenmiş, bu örneklerin birinde (DT) de CGC (Arg)→CAC (His) mutasyonu saptanmıştır. Saptanılan bu mutasyonlar literatürlerde en sık görülen G:A transisyonları gurubuna girmektedir.

Bu çalışmada, kolon kanserlerinde allele özgü oligonükleotid (ASO) hibridizasyonu yöntemi ile saptanan K-ras ve p53 gen mutasyonlarının doğrulanması ve bu yolla saptanamayanların belirlenmesi amacı ile aynı doku örneklerinde DNA dizi analizi yöntemi uygulanmış ve amaçlanan hedeflere ulaşılmıştır.

DT örneğinde ASO hibridizasyonu yöntemi ile saptanılan K-ras kodon 12 G:T transversiyon mutasyonu (55) dizi analizi yöntemi ile de doğrulanmıştır. Kodon 12 G:C transversiyon mutasyonunu saptamak için kullanılan Fnu4H1 restriksiyon enzim kesimi bulguları da dizi analizi yöntemi ile doğrulanmıştır. Ayrıca p53 geni dizi analizi sonuçları da ASO hibridizasyonu sonuçlarını (56) doğrulamaktadır. ASO hibridizasyonu yöntemi ile spesifik olarak incelenen kodon 249'da herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Bununla beraber DNA dizi analizinin vermiş olduğu detaylı bilgiler ile CT örneğindeki p53 geni kodon 248 CGG→CAG, DT örneğindeki kodon 175 CGC→CAC ve HT örneğindeki K-ras geni kodon 12 GGT→GAT mutasyonları tesbit edilmiştir.

Bir örnekte tesbit edilen K-ras ve p53 gen mutasyonlarının bir arada gözlenmesi, Bert Vogelstein ve gurubu tarafından tanımlanan kolorektal kanser gelişiminin genetik modeline uymaktadır (15). Büyük bir olasılıkla incelememiz dışında kalan diğer bölgelerde de mutasyonlar bulunabilir.

Dizi analizi teknolojisindeki son gelişmeler ile kanser gelişiminde rol alan genlerin baz dizilerinin detaylı ve hızlı bir şekilde analizi yapılabilmekte ve somatik mutasyonların tanımlanarak insan kanserlerinin gelişimindeki rolünün anlaşılması sürecine hız kazandırılmaktadır.

Kolon kanserlerinin gelişiminde rol alan genetik değişimlerin belirlenmesi, erken tanıdan prognoz ve tedaviye kadar oldukça geniş açılımlar sunmaktadır. Kanser henüz yerleşmediği ve tanımlamanın zor olduğu erken evrede, bilinen bu gen mutasyonlarının taranması ile olası ilerlemenin önüne geçilmesi mümkün olabilecektir.

Spesifik nokta mutasyonlar ile kanserin biyolojik davranışlarının nasıl etkilendiği yapılan çalışmaların odak noktasını oluşturmaktadır. Kolorektal kanserli hastalarda mutant p53 proteini taşıyan hastaların genellikle prognozunun kötü seyrettiği (45), K-ras geni kodon 12 spesifik mutasyonlu kanserlerin ise metastaz gösterme eğiliminde oldukları (57) yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. K-ras ve

p53 gen mutasyonları bir arada görülen hastalarda, bu mutasyonların gözlenmediği veya sadece birinin gözleendiği hastalara oranla hayatta kalma şansının yarı yarıya azaldığı saptanmıştır (44). Bu bağlamda bireyin genetik yapı farklılığı ve sahip olduğu diğer mutant genlerin de bu sürecin gelişimini etkileyebileceği düşünülmektedir. Ayrıca tedaviye verilecek cevabın ve bireyin kansere olan genetik yatkınlığının önceden belirlenmesi, spesifik gen mutasyonlarının incelenmesi ile sağlanabilecektir.

Sonuç olarak, kolorektal kanserlerin moleküler mekanizmaları ve kliniğe yansımaları açısından oldukça önemli görülen K-ras ve p53 gen mutasyonlarının belirlenmesinde, DNA dizi analizi yöntemi yüksek duyarlılık ve etkinliğe sahiptir. Bununla beraber bilinen mutasyonların daha kısa sürede belirlenmesinde ASO hibridizasyonu güvenilir ve başarılı bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

1. Weinberg, B. A.: The genetic origins of human cancer. *Cancer* 61: 1963-1968, 1988.
2. Yokota, J., Sugimura, T.: Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes. *FASEB J.* 7: 920-925, 1993.
3. Harris, C.C.: Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res (Suppl.)* 51: 5023-5044, 1991.
4. Shields, P.G., Harris, C.C.: Molecular epidemiology and the genetics of environmental cancer. *JAMA* 266: 681-687, 1991.
5. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.: *Molecular biology of the cell*. Garland publishing, inc. Third edition. New York&London, 1994.
6. Bishop, J. M.: Molecular themes in oncogenes. *Cell* 64: 253-248, 1991.
7. Tabin, C.J., Bradley, S. M., Bargmann, C. I.: Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300: 143-149, 1982.
8. Harris, H.: How tumour suppressor genes were discovered. *FASEB J.* 7: 978-979, 1993.
9. Fearon, E.R.: Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer. *Science* 278: 1043-1050, 1997.
10. Harris, C.C., Hollstein, M.: Clinical implication of the p53 tumor-suppressor gene. *N. Engl. J. Med.* 329: 1318-1327, 1993.
11. Bishop, J.M.: The molecular genetics of cancer. *Science* 235: 305-311, 1987.
12. Cairns, J.: The origin of human cancers. *Nature* 289: 353-357, 1981.
13. Bedenne, L., Faivre, J., Boutron, M.C., et al.: Adenoma-carcinoma sequence or "De Novo" carcinogenesis? *Cancer* 69: 883-888, 1992.
14. Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., et al.: Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* 111: 307-317, 1996.

15. Fearon, E. R., Vogelstein, B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 1990.
16. Carether, J.M.: The cellular and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Gastroenterology Clinics of North America* 25: 737-754, 1996.
17. Wilson, R.H., Whiteside, M.C., Russell, S.E.: Molecular genetics of colorectal cancer (part 1). *Clinical Oncology* 9: 14-19, 1997.
18. Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., et al.: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319: 525-532, 1988.
19. Stern, H.S.: Contributions of molecular genetics to the clinical management of colorectal cancer. *Am. J. Surg.* 171: 10-15, 1996.
20. Sandler, R.S.: Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterology Clinics of North America* 25: 717-736, 1996.
21. Bos, J.L.: ras oncogenes in human cancer. *Cancer Res.* 49: 4682-4689, 1989.
22. Lowy, D.R.: Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 851-891, 1993.
23. Cox, A.D., Der, C.J.: Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: Targeting simply ras? *Biochimica et Biophysica Acta* 1333: F51-F71, 1997.
24. Yamashita, N., Minamota, T., Ochiai, A., et al.: Frequent and characteristic K-ras activation in aberrant crypt foci of colon. *Cancer* 75: 1527-1533, 1995.
25. Levine, A.J.: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331, 1997.
26. Vogelstein, B., Kinzler, K.W.: p53 function and dysfunction. *Cell* 70: 523-526, 1992.
27. Greenblatt, M.S., Bennet, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C.: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54: 4855-4878, 1994.
28. Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., et al.: Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281: 1677-1679, 1998.
29. Almog, N., Rotter, V.: Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1333: F1-F27, 1997.
30. Lane, D.P.: p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992.

31. Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., et al.: Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356: 215-221, 1992.
32. Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A.: The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-456, 1991.
33. Srivastava, S., Zou, Z., Pirolo, K., et al.: Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348: 747-749, 1990.
34. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C.: p53 mutations in human cancer. *Science* 253: 49-53, 1991.
35. Pfeifer, G.P., Holmquist, G.P.: Mutagenesis in the p53 gene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1333: M1-M8, 1997.
36. Bressac, B., Kew, M., Wands, J., Öztürk, M.: Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 350: 429-431, 1991.
37. Ohue, M., Tomita, N., Monden, T., et al.: A frequent alteration of p53 gene in carcinomain adenoma of colon. *Cancer Res.* 54: 4798-4804, 1994.
38. Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., et al.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217-221, 1989.
39. Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., et al.: p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 50: 7717-7722, 1990.
40. Sidransky, D., Tokino, T., Hamilton, S.R., et al.: Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 256: 102-105, 1992.
41. Hibi, K., Robinson, C.R., Booker, S., et al.: Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 58: 1405-1407, 1998.
42. Kressner, U., Inganäs, M., Byding, S., et al.: Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 17: 593-599, 1999.
43. Wilson, R.H., Whiteside, M.C., Russell, S.E.: Molecular genetics of colorectal cancer (part 2). *Clinical Oncology* 9: 79-82, 1997.

44. Bell, S.M., Scott, N., Cross, D., et al.: Prognostic value of p53 overexpression and c-Ki-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 104: 57-64, 1993.
45. Pricolo, V.E., Finkelstein, S.D., Wu, T-T., et al.: Prognostic value of TP53 and K-ras-2 mutational analysis in stage III carcinoma of the colon. *Am. J. Surg.* 171: 41-46, 1996.
46. Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., et al.: Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249: 912-915, 1990.
47. Davis, B.M., Koc, O.N., Lee, K., et al.: Current progress in the gene therapy of cancer. *Current Opinion in Oncology* 8: 499-508, 1996.
48. Culver, K.W., Blaese, R.M.: Gene therapy for cancer. *TIG* 10(5): 174-178, 1994.
49. Kaufman, P.B., Wu, W., Kim, D., Cseke, L.J.: *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. CRC Press, Boca Raton. 1995.
50. Old, R.W., Primrose, S.B.: *Studies in microbiology. Principle of gene manipulation. An introduction to genetic engineering*. Fifth edition. Blackwell Science, Oxford. 1994.
51. Arnheim, N., Erlich, H.: Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 131-156, 1992.
52. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., et al.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988.
53. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1982.
54. Griffin, H. G., Griffin, A.M.: DNA sequencing. *App. Biochem. Biotech.* 38: 147-159, 1993.
55. Akyol, M.: Kolorektal karsinomlarda K-ras mutasyonlarının ASO ve restriksiyon enzim analizi ile tanısı. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 1998.
56. Aktan, M. B.: Kolon kanserleri gelişiminde rol alan p53 geni mutasyonlarının saptanması. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 1998.
57. Finkelstein, S. D., Sayegh, R., Christensen, S.: Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 71: 3827-3838, 1993.

KISALTMALAR

A	: Adenin
APC	: Adenomatöz polipozis koli geni
APS	: Amonyum persülfat
Arg	: Arjinin
bç	: Baz çifti
C	: Sitozin
CpG	: Sitozin- guanin dinükleotidleri
DCC	: Kaybedilmiş kolorektal kanser geni
ddNTP	: Dideoksinükleotid trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetra asetik asit
FAP	: Ailesel adenomatöz polipozis
G	: Guanin
GAP	: GTPaz aktive eden protein
Gln	: Glutamin
Gly	: Glisin
GNRP	: Guanin nükleotidini salıveren protein
HBV	: Hepatit B virüsü
His	: Histidin
HNPCC	: Herediter polipozis-olmayan kolon kanseri
kD	: Kilodalton
KRK	: Kolorektal kanser / -ler
LOH	: Heterozigotluğun kaybı
MuSV	: Murine sarkoma virüs
PCNA	: Prolifere hücre nükleer antijeni
p53	: p53 geni / proteini
Pu	: Pürin bazı
Py	: Pirimidin bazı
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
T	: Timin
TBG	: Tümör baskılayıcı gen
wt	: yabani, doğal tip

ÖZGEÇMİŞ

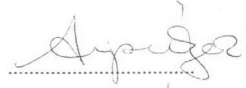
1973 yılında Antakya'da doğdu. Üniversite lisans eğitimini İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümünde 1995 yılında tamamladı. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans programına başladı. 1996 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü ile Berlin Teknik Üniversitesi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Bölümünün ortaklaşa düzenlediği protein saflaştırılması ve karakterizasyonu konulu biyokimya lisansüstü yaz okuluna katıldı. 1997 yılında Bristol, Brussels Free, Justus Liebig (Giessen) ve İstanbul Üniversitelerinin organize ettiği "International Islet Training" kursuna katıldı. 1996 yılından günümüze Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans öğrencisi Mustafa AKKİPRİK'in, çalışması jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

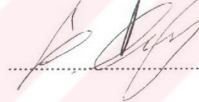
Tez Danışmanı : Doç.Dr.Ayşe ÖZER
Üniversitesi : Marmara



Üye : Prof.Dr.Beyazıt ÇIRAKOĞLU
Üniversitesi : Marmara




Üye : Yrd.Doç.Dr.İlter GÜNEY
Üniversitesi : Marmara



ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 25./08./1999. tarih ve 01..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof.Dr. Sevim ROLLAS
Müdür