

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLLOJİ ANABİLİM DALI

MUĞLA BÖLGESİNDEKİ KOLOREKTAL
KANSER HASTALARINDA PIK3CA
GENİNDEKİ BAZI BÖLGELERİN
MUTASYON ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TANER KAYNAR

EYLÜL 2016

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MUĞLA BÖLGESİNDEKİ KOLOREKTAL
KANSER HASTALARINDA PIK3CA
GENİNDEKİ BAZI BÖLGELERİN
MUTASYON ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TANER KAYNAR

EYLÜL 2016

MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

TANER KAYNAR tarafından hazırlanan **MUĞLA BÖLGESİNDEKİ KOLOREKTAL KANSER HASTALARINDA PIK3CA GENİNDEKİ BAZI BÖLGELERİN MUTASYON ANALİZİ** başlıklı tezinin, 05/09/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL

(Jüri Başkanı, Danışman)

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Yrd. Doç. Dr. Murat KARA (Üye)

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

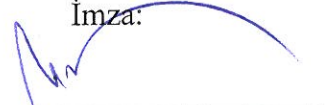
Doç. Dr. Mehtap Kılıç EREN (Üye)

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı,
Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın

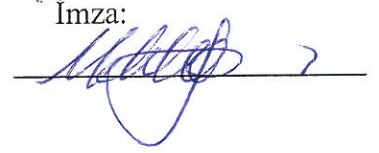
İmza:



İmza:



İmza:

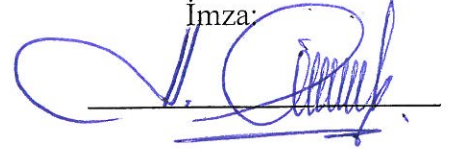


ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK

Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL

Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

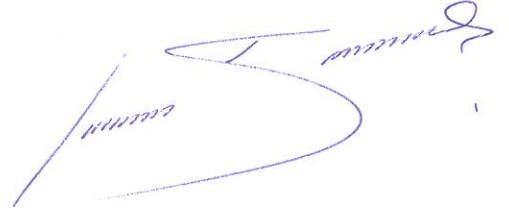


Savunma Tarihi: 05/09/2016

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Taner KAYNAR

05/09/2016



ÖZET

MUĞLA BÖLGESİNDEKİ KOLOREKTAL KANSER HASTALARINDA PIK3CA GENİNDEKİ BAZI BÖLGELERİN MUTASYON ANALİZİ

Taner KAYNAR

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL

Eylül 2016, 108 sayfa

Kalın bağırsak, sindirim sisteminin önemli bir parçası olup çekum, kolon ve rektum yapılarından meydana gelmektedir. Kolon ve rektum kısımlarından herhangi birinde meydana gelen kanserleşme, kolorektal kanser (KRK) olarak adlandırılmaktadır. KRK, dünya çapında hem erkek hem de kadınlarda en sık olarak görülen kanser türlerinden bir tanesi olmuştur. Kanserın moleküler temelının anlaşılması adına üzerinde en çok çalışma yapılan kanser türlerinden biri de kolorektal kanserdir. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) hücre proliferasyon, yayılma ve hayatta kalması için sinyal yollarının başlatılmasında kritik bir lipid kinaz ailesidir. Fosfatidilinositol 4,5- bisfosfat 3-kinaz katalitik alt ünite alfa (PIK3CA), 34 kb' lik bir gen olup 20 exondan oluşmaktadır. Ayrıca 1068 amino asitten oluşan 124kDa'luk p110 α proteinini kodlar ve 3.kromozomun 3q26.3 bölgesinde lokalizedir.

Yapılan birçok çalışmada PIK3CA geni üzerindeki bölgeleri, hotspot mutasyon bölgeleri olarak tanımlanmıştır. p110 α proteinin helikal domaini exon 9 tarafından kodlanırken kinaz domaini ise exon 20 tarafından kodlanmaktadır. Literatür taramaları sonucunda PIK3CA geninin çeşitli insan kanseri tiplerinde mutasyona uğradığı ve kanser gelişiminde etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca *PIK3CA* mutasyonlarının yoğun olarak exon 9 ve exon 20 bölgelerinde kümелendiğı bildirilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında, Muğla bölgesindeki kolorektal kanserli hastalarda PIK3CA geninin exon 9 ve exon 20 onkojenik mutasyonlarının belirlenmesi ve kolorektal kanser gelişimi üzerindeki etkilerinin tartışılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada Muğla Sıtkı Koçman Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne gelerek kolorektal kanser tanısı almış olan 30 adet hastaya ait parafin bloklara gömülü doku örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada kontrol grubu olarak, bu 30 kolorektal kanserli hastanın 20 tanesine ait sağlıklı kolon dokusu (tümör kontrol grubu) ve 30 adet de kolonunda herhangi bir tümörleşme olmayan hastalara ait parafin bloklara gömülü doku örneğı kullanılmıştır. Toplamda 80 adet parafine gömülü doku örneğinden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.

Daha sonra her bir DNA örneğinde, PIK3CA geninin exon 9 ve exon 20 bölgeleri, ilgili primerler ile PCR’da çoğaltılmıştır. 80 adet örneğe ait 240 adet PCR ürününün BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit kullanılarak sekans PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Sekans PCR ürünleri, Sanger sekanslama metodu kullanılarak Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazında sekanslama işlemine tabi tutulmuş ve ilgili gen bölgelerine ait DNA dizileri çıkarılmıştır. 240 adet sekans dosyası Sequencing Analysis v.5.3.1 ve SeqScape v.2.6 Software’lerinde analiz edilerek PIK3CA genine ait exon 9 ve exon 20 bölgeleri üzerindeki mutasyon bölgeleri tespit edilmiştir. Daha sonra bu mutasyon bölgelerindeki nükleotid değişimleri ile amino asit değişimleri Ensembl ve NCBI veri tabanlarında biyoinformatik analizler ile tespit edilmiştir.

Bu tez çalışması sonucunda, PIK3CA geninin exon 9 bölgesinde, 1 hastada c.1571 G>A (R524K) heterozigot, 2 hastada c.1624 G>A (E542K) heterozigot, 3 hastada c.1664+105 T>G heterozigot, 9 hastada ise c.1634 A>C (E545A) heterozigot ve c.1658_1659delGTInsC (S553Thr) heterozigot mutasyon birlikteliği tespit edilmiştir. Toplam 12 kolorektal tümörlü vakada tespit edilen mutasyonların tamamı helikal domain (exon 9) üzerinde kümelenmiştir. Kinaz domaini (exon 20) üzerinde ise herhangi bir mutasyon gözlemlenmemiştir. Ayrıca çalışmaya alınan 20 tümör kontrol ve 30 normal kontrol olmak üzere toplam 50 adet kontrol grubunun exon 9 ve exon 20 bölgelerinde herhangi bir mutasyon gözlemlenmemiştir. Tespit edilen mutasyonlar kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında sadece tümörlü olgularda mutasyonların gözlemlenmesi bu mutasyonların somatik mutasyonlar olduğunu göstermiştir. Çalışma sonucunda PIK3CA mutasyonlarının sıklığı %40 oranında bulunmuştur. Bu durum, literatürdeki oranlara kıyasla Muğla Bölgesindeki kolorektal kanserli hastalarda PIK3CA mutasyonlarının daha sık olduğunu göstermiştir. Tespit edilen mutasyonlardan E545A ve E542K mutasyonlarının, literatür taramaları sonucunda lipid kinaz aktivitesi üzerinde artırıcı bir etkisi olduğu bildirilmiştir. E545A ve S553Thr mutasyon birlikteliği de Cowden Sendromu olarak bildirilirken, R524K ve c.1664+105 T>G mutasyonlarının lipid kinaz aktivitesi ile ilişkisinin bilinmediği rapor edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal Kanser, PIK3CA, Mutasyon, Sanger Sekanslama

ABSTRACT
MUTATION ANALYSIS OF SOME REGIONS OF PIK3CA GENE OF
COLORECTAL CANCER PATIENTS IN MUĞLA REGION

Taner KAYNAR

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Bekir ÇÖL

September 2016, 108 pages

Large intestines are an important part of digestive system and are composed of cecum, colon and rectum. Cancer formation in any of the colon or rectus is named as colorectal cancer (CRC). CRC is one of the most widely encountered cancer types in the world. Furthermore, CRC is one of the most studied cancer types in order to understand molecular mechanisms of cancer. Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) is a critical lipid kinase involved in initiating the signal cascades for cell proliferation, invasion and survival. Phosphatidylinositol 4-5 bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA) of PI3K is a gene of 34kb length and 20 exons. PIK3CA encodes the p110 α protein of 124kDa and is localized on the 3q26.3 region of Chromosome 3.

Exons 9 and 20 of the PIK3CA were determined by numerous studies as one of the hotspot mutation regions. Exon 9 and exon 20 encodes the helical and kinase domains of p110 α protein, respectively. As a result of literature searches, PIK3CA gene was found to be mutated in various cancer types and is implicated to be involved in cancer development. Also, it was stated that the mutations were mostly grouped on Exon 9 and 20 regions of PIK3CA gene. This thesis study, therefore, aims to identify oncogenic mutations on the exon 9 and exon 20 regions of PIK3CA gene of the colorectal patients of Muğla region and discuss the effects of such mutations on the development of colorectal cancer within the context of current literature.

In this study, the paraffin-embedded tissue samples (FFPE) of a number of 30 patients diagnosed with colorectal cancer at Muğla Sıtkı Koçman University Training and Research Hospital were used. Additionally, a number of 20 normal colon tissues out of the 30 colorectal patients (tumor control group) as well as a number of 30 normal FFPE tissues taken from the patients without any apparent colon tumor were included in the study as control groups.

Genomic DNAs were isolated from a total of the 80 FFPE tissues and the regions of exon 9 and 20 of PIK3CA gene were amplified with PCR using appropriate primers. A number of 240 PCR products belonging to a total of 80 samples were subject to sequencing PCR using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. The products of sequencing reactions were then subject to Sanger sequencing using Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer and DNA sequences of the gene regions were obtained. The sequencing results were analyzed using the software Sequencing Analysis v.5.3.1 and SeqScape v.2.6 and mutated regions were identified. Then, amino acid changes corresponding to the mutated nucleotides were determined by the use of Ensembl ve NCBI databases and bioinformatics analyzes. As a result of this study, the mutations were detected on the exon 9 of PIK3CA. These are c.1571 G>A (R524K) heterozygote mutation in 1 patient, c.1624 G>A (E542K) heterozygote mutation in 2 patients, c.1664+105 T>G heterozygote mutation in 3 patients and c.1634 A>C (E545A) heterozygote mutation together with c.1658_1659delGTInsC (S553Thr) heterozygote mutation in 9 patients. All of the mutations detected in a total of 12 patients were only seen on the exon 9. No mutations were evident on the exon 20 as a result of this study. Moreover, no mutations were detected on the exon 9 and 20 in the control groups (n=50) of tumor (n=20) and healthy controls (n=30). Therefore, these mutations were classified as somatic mutations due to their sole existence in the tumor tissues. Consequently, the frequency of PIK3CA mutations was calculated as 40% as a result of this study and out of a number of selected 30 colorectal cancer patients. This ratio shows that PIK3CA mutations were seen relatively higher in the colorectal cancer patients of Muğla region compared to the numbers elsewhere in the literature. Among the mutations detected, E545A and E542K mutations were reported in the literature that they increase lipid kinase activity. E545A and S553Thr mutations were also seen in the patients with Cowden Syndrome. The effect of R524K and c.1664+105 T>G mutations on lipid kinase activity has not been reported in the literature.

Keywords: Colorectal Cancer, PIK3CA, Mutation, Sanger Sequencing



Sevgili Ailem,
Annem, Kardeşlerim ve Nişanlım'a

ÖNSÖZ

Lisans eğitimim ve yüksek lisans eğitimim süresince değerli bilgilerini benden esirgemeyen, her türlü bilgi ve tecrübesini paylaşarak, aynı zamanda manen de yanımda olan, danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL' e teşekkür ederim.

Deneylerimin yapılması esnasında laboratuvar imkânlarını sunarak, değerli görüş ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat KARA'ya, çalışmalar sırasında her türlü desteğini benden esirgemeyen Dr. Havva Solak ÖZŞEKER, Dr. Mert METİN ve tez jürim Sayın Doç. Dr. Mehtap Kılıç EREN hocalarıma teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları sırasında arkadaşlıklarını ve manevi olarak desteklerini, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarım, dostlarım Merve SEZER, Esra DİBEK, Seda KANLIKAYA, Begüm Hazar GÖKCAN, Bilge UÇAR, Esra ESMERAY, Gökçe HAS, Ebru BALCI, Mehmet KARAALİ ve Usay YASU'ya tüm Moleküler Biyoloji ve Biyokimya Laboratuvarı ekibine teşekkür ederim. Ayrıca MSKÜ Eğitim ve Araştırma Hastanesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı ile Tıbbi Genetik Laboratuvarı'ndaki değerli dostlarım Hamdi AYDIN, Özkan OLKAÇ, İlknur BAŞER ve Hümeysra AKSOY'a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde yanımda olan, her zaman bana destek olan desteğini ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen canım annem Gülbahar KAYNAR, kardeşlerim Nuray SALCI, Serkan KAYNAR, Erkan KAYNAR, Erdoğan KAYNAR, Soner KAYNAR, Caner KAYNAR'a, kardeşlerimin eşlerine ve canımdan çok sevdiğim sevgili nişanlım Burçin ÜN'e sonsuz teşekkür ederim.

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri) birimine ve MSKÜ Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kolon Hakkında Genel Bilgi.....	1
1.2. Kolorektal Kanser Hakkında Genel Bilgi	2
1.2.1. Epidemiyoloji	3
1.2.2. Histoloji	4
1.2.3. Etiyoloji	5
1.3. Kolorektal Kanserlerde Histopatoloji	9
1.3.1. Adenokarsinom.....	11
1.3.2. Müsinöz adenokarsinom.....	12
1.3.3. Taşlı yüzük hücreli karsinom.....	13
1.3.4. Küçük hücreli karsinomlar	14
1.3.5. Undiferansiye karsinomlar.....	14
1.3.6. Skuamöz/adenoskuamöz karsinomlar	15
1.4. Kolorektal Kanser Karsinogenezi	17
1.5. Kolorektal Kanser ve Genetik.....	19
1.5.1. Ailesel adenomatöz polipozis (Familial Adenomatous Polyposis, FAP). 20	
1.5.2. Kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, HNPCC)	22
1.6. PIK3CA (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha)	24
1.6.1. PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)	24
1.6.2. PIK3CA (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha) Geni.....	25
1.6.3. PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyon yolağı.....	28
1.7. DNA Dizileme Yöntemleri	31

1.7.1. Maxam-Gilbert DNA dizileme yöntemi	32
1.7.2. Sanger sekanslama yöntemi	34
2. MALZEME VE YÖNTEM	38
2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	38
2.2. Parafine Gömülü (FFPE) Doku Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu	39
2.2.1. QIAamp DNA FFPE Tissue Kit DNA izolasyon protokolü	39
2.3. İzole Edilen Genomik DNA'ların Nanodrop ile Konsantrasyon ve Saflık Derecelerinin Ölçülmesi	41
2.4. Genomik DNA'ların Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Görüntülenmesi	42
2.5. Genomik DNA Örneklerinde PIK3CA Geninin Exon 9 ve Exon 20 Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle Çoğaltılması	43
2.6. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Görüntülenmesi	45
2.7. PCR Ürünlerinin ExoSAP Enzimi İle Purifikasyonu	45
2.8. Sekans Reaksiyonlarının Hazırlanması	46
2.9. Sekans PCR Ürünlerinin Sephadex İle Purifikasyonu	49
2.10. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer Cihazı	50
2.10.1. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazında yıkama işlemi ve cihaz solüsyonlarının hazırlanması	50
2.10.2. Foundation Data Collection v.3 Software'inde çalışma ile ilgili sonuç grubunun oluşturulması	52
2.10.3. Foundation Data Collection v.3 Software'inde çalışma ile ilgili run modülünün oluşturulması	52
2.10.4. Seq Scape v.2.6 Software'inde çalışma ile ilgili projenin oluşturulması	53
2.11. Kapiller Jel Elektrofrezisi	54
2.12. Sekanslanan Örneklerde Exon 9 ve Exon 20 Bölgelerinin Mutasyon Analizi	56
2.13. Biyoinformatik Analiz	56
3. BULGULAR	57
3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	59
3.2. Parafine Gömülü (FFPE) Doku Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu	62
3.3. İzole Edilen Genomik DNA'ların Nanodrop ile Konsantrasyon ve Saflık Derecelerinin Ölçülmesi	64
3.4. Genomik DNA Örneklerinde PIK3CA Geninin Exon 9 ve Exon 20 Bölgelerinin PCR İle Çoğaltılması	68
3.5. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer Cihazı	71
3.6. Sekanslanan Örneklerde Exon 9 ve Exon 20 Bölgelerinin Mutasyon Analizi	72
3.7. Biyoinformatik Analiz	79

4. TARTIŞMA	80
KAYNAKLAR	93
EKLER.....	104
ÖZGEÇMİŞ.....	108



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1. Kolorektal kanserlerde dünya sağlık örgütünün (WHO) histolojik tiplendirme ve sınıflandırması (ICD-O: Uluslararası hastalık sınıflandırması-onkoloji).....	10
Çizelge 2. 1. Exon 9 ve exon 20_1 bölgelerine ait PCR programı.....	44
Çizelge 2. 2. Exon 20_2 bölgesine ait PCR programı.	44
Çizelge 2. 3. PRC’da kullanılan exon 9 ve exon 20 bölgelerine ait primerler ve sekansları.	44
Çizelge 2. 4. ExoSAP PCR programı.....	46
Çizelge 2. 5. Sekanslamada kullanılan exon 9 ve exon 20 bölgelerine ait primerler ve sekansları.	47
Çizelge 2. 6. Exon 9 bölgesi için hazırlanan sekans reaksiyon içeriği.	47
Çizelge 2. 7. Exon 20_1 bölgesi için hazırlanan sekans reaksiyon içeriği.	48
Çizelge 2. 8. Exon 20_2 bölgesi için hazırlanan sekans reaksiyon içeriği.	48
Çizelge 2. 9. Sekans_PCR programı.	49
Çizelge 2. 10. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazında sekanslama işlemi için oluşturulan run modülü değerleri.	53
Çizelge 3. 1. Tümör grubuna ait olguların demografik ve klinikopatolojik özellikleri.....	59
Çizelge 3. 2. Kontrol grubuna ait örneklerin demografik özellikleri.....	61
Çizelge 3. 3. Tümör grubuna ait örneklerin DNA konsantrasyon ve saflık değerleri.	64
Çizelge 3. 4. Tümör kontrol grubuna ait örneklerin DNA konsantrasyon ve saflık değerleri.....	66
Çizelge 3. 5. Kontrol grubuna ait örneklerin DNA konsantrasyon ve saflık değerleri.	67
Çizelge 4. 1. Kolorektal kanserli hastalarda tespit edilen mutasyonlar.....	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Kolon yapısının anatomik görünümü.....	2
Şekil 1. 2. Kolon duvarının histolojik görünümü.....	5
Şekil 1. 3. Kolorektal kanserde kolon içerisinde oluşan polipler.....	7
Şekil 1. 4. Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin kolon içerisindeki şematik gösterimi..	8
Şekil 1. 5. Kolorektal kanserin kolon içerisindeki dağılımı.....	9
Şekil 1. 6. Kolorektal adenokarsinomlarda grade aşamaları.....	11
Şekil 1. 7. Müsinöz tipte adenokarsinomun histopatolojik görünümü.....	12
Şekil 1. 8. Taşlı yüzük hücreli adenokarsinomun histopatolojik görünümü.....	13
Şekil 1. 9. Küçük hücreli karsinomun histopatolojik görünümü.	14
Şekil 1. 10. Undiferansiye karsinomun histopatolojik görünümü.	15
Şekil 1. 11. Skuamöz hücreli karsinomun histopatolojik görünümü.	16
Şekil 1. 12. Adenoskuamöz hücreli karsinomun histopatolojik görünümü.	16
Şekil 1. 13. Kolorektal karsinogenezde Vogelstein ve Fearon modeli.	18
Şekil 1. 14. Kolorektal kanserde heterojenite.	19
Şekil 1. 15. Wnt/ β -katenin sinyalizasyon yolağı.....	21
Şekil 1. 16. HNPCC'ye neden olan DNA tamir genlerindeki mutasyonlar ve yaklaşık oranları.	23
Şekil 1. 17. PI3K izoformları.	25
Şekil 1. 18. PIK3CA geninin 3.kromozom üzerindeki lokalizasyonu	26
Şekil 1. 19. PIK3CA (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha.....	27
Şekil 1. 20. p110a protein domainleri.	28
Şekil 1. 21. PIK3CA ile etkileşim içerisinde olan diğer genler.	28
Şekil 1. 22. PI3K/AKT/mTOR Sinyalizasyon yolağı..	31
Şekil 1. 23. Maxam-Gilbert DNA dizileme yönteminin şematik görünümü.	33
Şekil 1. 24. dNTP ve ddNTP'lerin biyokimyasal yapıları.	35
Şekil 1. 25. Sanger sekanslama için hazırlanan dört farklı ddNTP reaksiyonunun şematik görünümü.	35
Şekil 1. 26. Sanger sekanslama sonrası şematik poliakrilamid jel görünümü ve dizileme.	36
Şekil 1. 27. Otomatize sistemler ile Sanger sekanslama işleminin şematik görünümü.	37

Şekil 3. 1. Bazı olgulara ait hematoksilen eozin ile boyanmış kolon doku örneklerinin mikroskopik görüntüsü.....	62
Şekil 3. 2. Tümör grubuna ait örneklerin genomik DNA izolasyon sonucunun %0,8'lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü.....	63
Şekil 3. 3. Tümör kontrol grubuna ait örneklerin genomik DNA izolasyon sonucunun %0,8'lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü.....	63
Şekil 3. 4. Kontrol grubuna ait örneklerin genomik DNA izolasyon sonucunun %0,8'lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü.....	63
Şekil 3. 5. Nanodrop cihazı.....	64
Şekil 3. 6. Tümör grubuna ait örneklerin PCR'da çoğaltılan exon 9 bölgelerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü.....	68
Şekil 3. 7. Tümör grubuna ait örneklerin PCR'da çoğaltılan exon 20_1 bölgelerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü.....	68
Şekil 3. 8. Tümör grubuna ait örneklerin PCR'da çoğaltılan exon 20_2 bölgelerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü.....	69
Şekil 3. 9. Tümör kontrol grubuna ait örneklerin PCR'da çoğaltılan exon 9 bölgelerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü.	69
Şekil 3. 10. Tümör kontrol grubuna ait örneklerin PCR'da çoğaltılan exon 20_1 bölgelerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü.	69
Şekil 3. 11. Tümör kontrol grubuna ait örneklerin PCR'da çoğaltılan exon 20_2 bölgelerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü.	70
Şekil 3. 12. Kontrol grubuna ait örneklerin PCR'da çoğaltılan exon 9 bölgelerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü.....	70
Şekil 3. 13. Kontrol grubuna ait örneklerin PCR'da çoğaltılan exon 20_1 bölgelerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü.....	70
Şekil 3. 14. Kontrol grubuna ait örneklerin PCR'da çoğaltılan exon 20_2 bölgelerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü.....	71
Şekil 3. 15. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazı ve iç haznesi.....	71
Şekil 3. 16. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazında polimer aktarma pompasının şematik görünümü.	72
Şekil 3. 17. T1 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların C1 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.	73
Şekil 3. 18. T2 kodlu tümör olgusunun intron 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonun C1 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.	73
Şekil 3. 19. T3 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların TC1 kodlu tümör kontrol ve C3 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.....	74
Şekil 3. 20. T4 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların C4 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.	75

Şekil 3. 21. T8 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların TC4 kodlu tümör kontrol ve C6 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.	75
Şekil 3. 22. T12 kodlu tümör olgusunun intron 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonun TC6 kodlu tümör kontrol ve C7 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.	76
Şekil 3. 23. T14 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların TC9 kodlu tümör kontrol ve C9 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.	76
Şekil 3. 24. T16 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların TC8 kodlu tümör kontrol ve C8 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.	77
Şekil 3. 25. T17 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların TC11 kodlu tümör kontrol ve C10 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.	77
Şekil 3. 26. T18 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların TC12 kodlu tümör kontrol ve C11 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.	78
Şekil 3. 27. T22 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların TC15 kodlu tümör kontrol ve C12 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.	78
Şekil 3. 28. T28 kodlu tümör olgusunun exon 9 ve intron 9 bölgelerinde tespit edilen mutasyonların C13 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü... 79	79
Şekil 4. 1. Kolorektal tümörlü 12 hastanın PIK3CA geninin exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların dağılımı.....	83
Şekil 4. 2. PIK3CA geninde mutasyonlar tespit edilen kolorektal tümörlü hastalara ait hematoksilen eozin ile boyanmış preparatların mikroskopik görüntüsü.	85
Şekil 4. 3. Kolorektal tümörlü 12 hastanın exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların kolon içerisindeki % dağılımı.....	86

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
A	Adenin
ABD	Adaptör Bağlanma Domaini
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
C	Sitozin
cm	Santimetre
C2	Tamamlayıcı Bileşen 2
C ₈ H ₁₀	Ksilen
dk	Dakika
DNA	Deoksirübo Nükleik Asit
ddNTP	Dideoksi Nükleotid Trifosfat
dNTP	Deoksi Nükleotid Trifosfat
DNaz	Deoksirübonükleaz
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EtBr	Etidium Bromür
FAP	Ailesel Adenomatöz Polipozis
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
FGFR	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
G	Guanin
gr	Gram
HNPCC	Kalıtsal Polipozis Olmayan Kolorektal Kanser
HNSCC	Baş ve Boyun Skuamöz Hücre Karsinomu
IRS	İnsülin Reseptör Substratı
kb	Kilobaz
kDA	Kilodalton

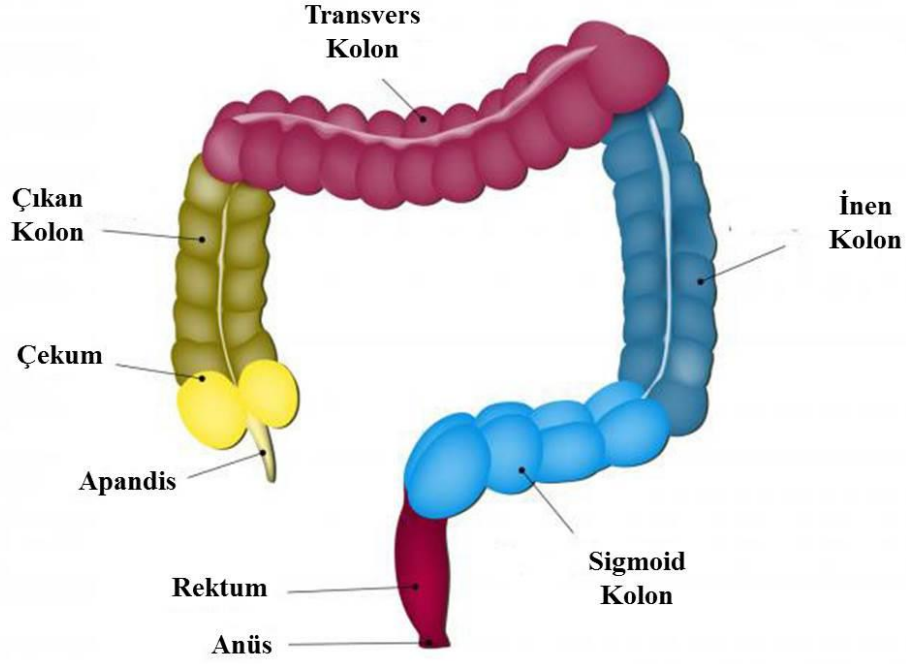
KRK	Kolorektal Kanser
kV	Kilovolt
MAPK	Mitojen Aktive Protein Kinaz
μ A	Mikroamper
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
m	Metre
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MLH1	MutL Homolog 1
MLH3	MutL Homolog 3
MMR	Mismatch Repair
MSH2	MutS Homolog 2
MSH6	MutS Homolog 6
MSI	Microsatellite Instability
mTOR	Memeli Rapamisin Hedefi
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogram
nm	Nanometre
O	Oksijen
OH	Hidroksil
OSCC	Oral Skuamöz Hücre Karsinomu
P	Fosfat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	Trombosit türevli büyüme faktörü
PDK	Piruvat Dehidrogenaz Kinaz
PI3K	Fosfatidilinositol 4,5- Bisfosfat 3-Kinaz
PIK3CA	Fosfatidilinositol 4,5- Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Ünite Alfa
PIP	Fosfatidilinositol 4,5- Bisfosfat
PKB	Protein Kinaz B

PKC	Protein Kinaz C
PMS1	Protein Homolog 1
pmol	Pikomol
PO ₄	Fosfat
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloğu
RBD	Ras Bağlanma Domaini
RNaz	Rübonükleaz
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
SAP	Shrimp Alkalın Fosfataz
SH2	Src Homoloji 2
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizm
T	Timin
TBE	Tris Borate EDTA
Tm	Erime Sıcaklığı
UV	Ultraviyole
V	Volt
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

1.1. Kolon Hakkında Genel Bilgi

Kolon ve rektum, sindirim sisteminin önemli bir parçası olan kalın bağırsağı oluşturur. Kalın bağırsak çekum, kolon ve rektum olmak üzere 3 kısımdan meydana gelir (Şekil 1.1.). Ortalama 1,5 m kadar olan kalın bağırsak, ileumun bitiminden anüse kadar uzanır ve sindirim sisteminin 1/5'ini oluşturur. Kalın bağırsağın son 20 cm'lik kısmı rektum olarak adlandırılırken, buradan ince bağırsağa kadar olan kısmı ise kolon olarak adlandırılır. Rektum, dışkının atılmadan önce son olarak tutulduğu yer olup, sigmoid kolon ile anüs arasına yerleşmiştir. Kolon ile rektumun birleştiği nokta sigmoid kolon olarak adlandırılır. İnce bağırsak ile kolonun birleştiği bölge ise çekum olarak isimlendirilir ve bu kısım 4-8 cm uzunluğunda, 7,5-8,5 cm genişliğinde olup kolonun en geniş kısmını oluşturur. Kısmi olarak sindirilmiş besin maddeleri ince bağırsaktan sonra kolona girer. Kolon bu besin maddelerinden su ve mineralleri ayırarak dolaşım sistemine kazandırırken geri kalan kısımları ise anüsten atılmak üzere bünyesinde depolar. Kolon; çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon olmak üzere 4 kısımdan meydana gelir. Çıkan kolon 15 cm uzunluğunda olup, çekumdan hemen sonraki kısımdır. Karın içerisinde sağ iliak bölge ile sağ lumbal bölge arasında yer alır. Transvers kolon, yaklaşık 50 cm uzunluğunda olup hepatic fleksura ile splenic fleksura arasında yer alır ve üzeri periton ile örtülü durumdadır. İnen kolon, transvers kolon ile sigmoid kolon arasında bulunur ve yaklaşık 25 cm uzunluğundadır. Sigmoid kolon, yaklaşık 40 cm uzunluğunda olup inen kolon ile rektum arasındaki bölgede bulunur.



Şekil 1. 1. Kolon yapısının anatomik görünümü.

1.2. Kolorektal Kanser Hakkında Genel Bilgi

Kolorektal kanser (KRK), kalın bağırsak kanseri olarak da adlandırılmakla birlikte kalın bağırsak ve rektumda görülen malign yani kötü huylu tümörlerin oluşumu anlamına gelmektedir. Kanser oluşumu hücre içerisinde başlar. Hücre büyümesi ve çoğalması, normalde vücudun ihtiyacı doğrultusunda kontrol altında bulunmaktadır. Hücrelerin bu kontrolden çıkarak büyüme, bölünme ve çoğalmaya gitmesiyle tümörler meydana gelir. Bu tümörler iyi veya kötü huylu olabilmektedir. Kanser gelişiminde ise kötü huylu tümörler ön plandadır.

Kolonda meydana gelen kansere kolon kanseri, rektumda meydana gelen kansere ise rektum kanseri adı verilirken bu organlardan herhangi birindeki kanser oluşumu kolorektal kanser olarak adlandırılır. Kolon ve rektum kanserleri bu organların iç yüzeyini çevreleyen hücrelerden gelişmektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kansere Daire Başkanlığı, www.kanser.gov.tr).

1.2.1. Epidemiyoloji

Kolorektal kanser, görülme sıklığı bakımından tüm kanserler arasında hem kadınlarda hem de erkeklerde 3. sırada yer almaktadır. Dünyada kolorektal kanser yüz binde 20'lerde iken, Avrupa ortalaması yüz binde 37, Türkiye'de ise yüz binde 17'lerdedir. KRK, erkeklerde 24,4/100.000, kadınlarda ise 15,3/100.000 sıklıkta görülmektedir (www.kanser.gov.tr). Dünyada her yıl yaklaşık 1 milyon yeni vaka teşhis edilmekle birlikte kolorektal kansere bağlı 500.000 ölüm bildirilmektedir. Dünya sağlık örgütü kayıtlarına göre her yıl teşhis konulan yeni vaka sayısı 800.000 civarındadır. 2003 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 147.500 yeni kolorektal kanser vakası tespit edilmiş (105.500 kolon, 42.000 rektal kanser) ve kolorektal kanser nedeniyle 57.000 ölüm bildirilmiştir. Bu sayı tüm kanser ölümlerinin %10'u gibi büyük bir bölümünden sorumludur. Başka bir yönden bakıldığında ABD de yaşayan insanların yaklaşık %5'i hayatları boyunca kolorektal kansere yakalanma riski taşımaktadır. Erkek/kadın oranı 1,3'dür. Bazı yayınlarda her iki cins arasında eşit dağılım olduğu bildirilmektedir (Dobrucalı, 2003). 2016 yılı içerisinde şuana kadar tespit edilen kolorektal kanser vaka sayısı 134.490 olup bunlardan 70.820'si erkek, 63.670'i ise kadındır. 2016 yılı içerisinde kolorektal kanser nedeniyle bildirilen ölüm sayısı 49.190 olup bunlardan 26.020'si erkek, 23.170'i ise kadındır (www.cancer.org).

Kolorektal kanser hem Batı hem de Asya ülkelerinde en yaygın olarak görülen malignitelerden biridir. KRK'de epigenetik ve genetik değişiklikler birçok kanserojenin birikmesi sonucu ortaya çıkar (Chen vd., 2014). Kolorektal kanser en sık görülen üçüncü kanser türüdür ve İsveç'deki kanser ölümlerinin en yaygın ikinci nedenidir. Kolon ve rektumda tümör hücrelerinin yayılması, tümör için bir ön koşul oluşturduğu gibi, kanserden ölüm nedeni olarak da kabul edilebilir (Birgisson vd., 2015).

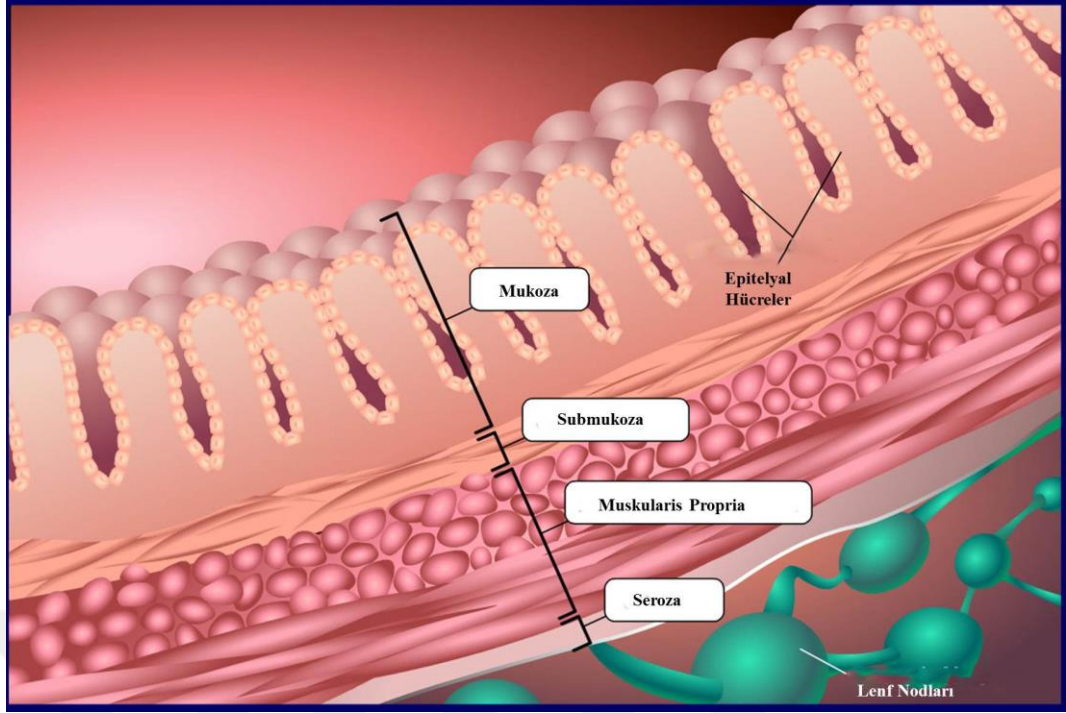
Kolorektal kanser, her yıl 1 milyondan fazla yeni vaka ile batı dünyasında en sık olarak görülen kanser türlerinden biridir. Primer kolorektal tümörlerin metastazı, doğrudan hastanın yaşamı ile bağlantılıdır ve hasta ölümlerinin yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. KRK'li hastaların yaklaşık olarak yarısı cerrahi ve çok modelli tedavi ile tedavi edilebilir ancak tedavi seçenekleri özellikle metastatik hastalarda sınırlıdır.

Bu durum, erken evredeki hastalarda % 90, bölgesel lenf nodu metastazı olan hastalarda %65 ve metastatik hastalarda %10'dan daha az olduğu gösterilmiştir (Koelzer vd., 2015).

Kolorektal kanser 2012 yılında dünya çapında, erkeklerde üçüncü (746.000 vaka'da %10), kadınlarda ise ikinci (614.000 vaka'da %9,2) en yaygın olarak görülen kanser türü olmuştur (Kawazoe vd., 2015). KKK, dünyada en sık görülen üçüncü kanser türüdür ve kanserden ölüm nedenleri arasında ikinci sırada gelir. KKK, Malezya'da da aynı artış eğilimini göstermiş ve hem erkek hem de kadınlarda görülen en yaygın ikinci kanser türü olmuştur (Tahir vd., 2015).

1.2.2. Histoloji

Kolonun ortasında bulunan lümen, 4 adet tabakayla çevrili durumdadır. Bu tabakalar dıştan içeriye doğru mukoza, submukoza, muskularis propria ve seroza şeklinde sıralanmıştır (Şekil 1.2.). Mukoza tabakası; epitelyum, kan ve lenf damarlarınca zengin lamina propria ve muskularis mukozadan oluşur. Submukoza, kan ve lenf damarlarınca zengin olup submukozal sinirler içeren gevşek bir bağ dokusudur. Muskularis propria tabakası, sirküler ve longitudinal kas tabakasından oluşur. Bu iki kas tabakası arasında kan ve lenf damarlarınca zengin olan gevşek bağ dokusu ile Auerbach sinir pleksusu vardır. Seroza; kan, lenf ve yağ dokusu bakımından zengin olup, ince ve gevşek bağ dokuyla örtülü durumdadır. Kalın bağırsağın rektum kısmı villus içermez. İntestinal bezler çok sayıda goblet ve emici hücre ihtiva eder. Emici hücreler düzensiz yapıda mikrovillüsler içerirler. Bu hücreler su Emilimini ve dışkı kıvamını oluşturlar, aynı zamanda da mukus salgırlar. Lamina propria lenf hücreleri ve nodüller bakımından zengindir. Lenfoid doku miktarının fazla ve yoğun olması ortamdaki bakteri popülasyonu ile ilişkilidir.



Şekil 1. 2. Kolon duvarının histolojik görünümü (www.wordpress.com).

1.2.3. Etiyoloji

Kolorektal kanserin tam olarak nedeni bilinmemek ile birlikte bu kanser gelişiminde birçok faktör rol oynamaktadır. Bu faktörler arasında; çevresel faktörler, yaş, diyet, adenom ve karsinom öyküsü, inflamatuvar bağırsak hastalığı olanlar ve aile öyküsü gibi birçok faktör etkili olabilmektedir (Kuşakçıoğlu, 2003). Kolorektal kanserler hem kalıtsal hem de sporadik olarak ortaya çıkarlar. Kolorektal kanser gelişiminde genetik ve çevresel faktörler ile birlikte prekanseröz hastalıklar da rol oynamaktadır (Büyükdogan, 2009).

Sporadik kolorektal kanser vakalarının %20'sinde aile öyküsü saptanmaktadır. 1. derece akrabasında kolorektal kanser bulunan insanlarda kolorektal kanser gelişme riski 2-3 kat, 1.derece akrabasında iki veya daha fazla kolon kanser hastası bulunan insanlarda ise bu riskin 3-4 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Akrabalar içerisinde 45 yaşından önce kolorektal kanser tespit edilenlerde risk artarken, 60 yaşından sonra tespit edilenlerde ise bu risk azalmaktadır.

Klinik olarak kolorektal kanser vakalarının %75'i 50 yaş üzerindeki insanlarda görülürken, ailede kolorektal kanser öyküsü olmayan 50 yaş üzeri insanların hayatları boyunca kolon kanserine yakalanma oranı %5 civarındadır (Dobrucalı, 2003).

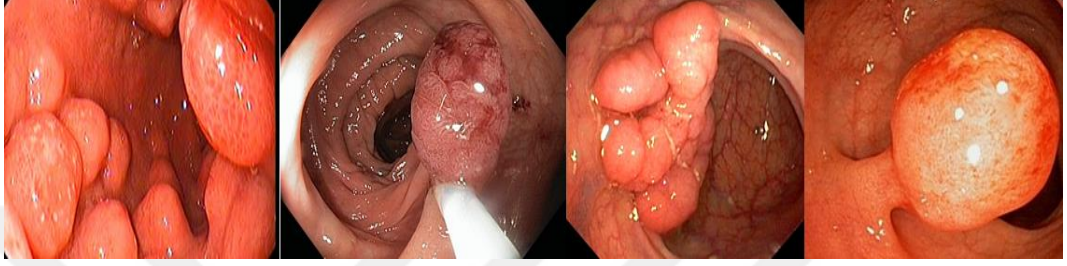
Kolorektal kanser her yaşta görülebilmesine rağmen en fazla 50 yaşından sonra gözlenmektedir. Kolorektal kanser görülme yaşı ortalama olarak 63'dür. Kolon kanseri görülme sıklığı bakımından kadınlarda daha yüksek iken rektum kanseri ise erkeklerde daha sık görülür. Kolorektal kanser tanılarının yaklaşık olarak %90'ı 50 yaşından sonra konulur. Bunun sebebi olarak, yaş ilerledikçe kolon yapısında meydana gelen mutasyonların artması gösterilmektedir (Hawk vd., 2002).

Kolorektal kanserlerin büyük bir çoğunluğunun kolonda daha önceden bulunan bir adenom zemininden geliştiği kabul edilir. Kolorektal kanser gelişme riski kolondaki adenom sayısı ve büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Bu adenomlar benign yani iyi huylu tümörler olup displastik kalın bağırsak epiteli ve stroma içerirler. Benign tümörlerin sayıları değişebilmektedir. 50 yaş altındaki hastalarda sık görülmeyen bu tümörlerin 70 yaş üzeri hastalarda görülme sıklıkları %53-63 arasındadır.(Dobrucalı, 2003; Pedro vd., 2005; Bozfakıoğlu ve Müslümanoğlu, 1997).

Adenom yapıları boyutlarına, yapısal oranlarına (tübüler, villöz, tubülovillöz), makroskopik görünümüne (düz, saplı, sesil) ve displazi derecelerine göre (hafif, orta, ağır) sınıflandırılabilirler. Genel olarak çıkarılan adenomatöz poliplerin %65-%80'i tubüler, %10-25'i tubülovillöz ve %5-10'u ise villöz adenomlardır (Kodner vd., 2003).

Kolorektal kanserde normal bağırsak mukozasından adenom, adenomdan ise kanser gelişme süreci değişkenlik gösterir. Adenomdan-karsinoma dönüşüm süreci olan adenokarsinomda kolon mukozası çeşitli evrelerden geçerek sonuçta kanserleşmiş bir yapı oluşturur. Çeşitli faktörler normal kolon epitelini uyarak bölünmekte olan farklılaşmamış hücrelerin kriptlerden ayrılarak villusların yüzeyine geçmesine neden olurlar. Villus yüzeylerine geçen bu hücrelerin sürekli olarak çoğalması sonucunda polip yani adenom yapıları oluşur (Şekil 1.3.). Hücre çoğalması ile birlikte kolon içerisindeki bez yapıları normal yapılarının dışına çıkar.

Bu düzensiz hücre büyümeleri zamanla muskularis mukozayı geçerek submukozayı invaze eder ve bunun sonucunda invaziv kanser gelişir (Kodner vd., 2003). Çeşitli radyolojik çalışmalar, poliplerin kansere 10 yıl gibi bir süre içerisinde dönüştüğünü ortaya koymuştur. Endoskopik olarak normal bir kolon içerisinde yeni bir polip oluşumunun 5 yıl, adenomdan displazi gelişiminin 2,5-3 yıl ve displaziden sonra invaziv kanser gelişiminin de 3 yıl kadar sürdüğü tahmin edilmektedir (Dobrucalı, 2003).



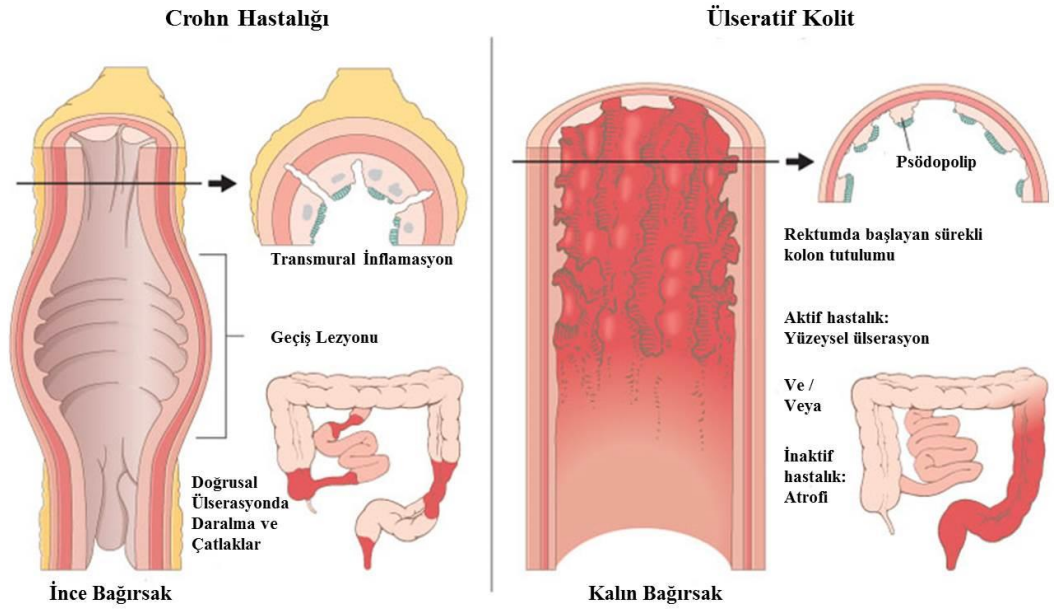
Şekil 1. 3. Kolorektal kanserde kolon içerisinde oluşan polipler (www.gastromedicine.com).

Kolorektal kanser görülme sıklığı bölgelere göre değişkenlik gösterdiğinden dolayı çevresel faktörler bu bakımdan önemlidir. Genetik olarak kanser gelişimine duyarlı olan kişilerde diyet ve çevresel faktörler karsinogeneze etkili olabilmektedir. Yağ ve kalori oranı düşük, fiber oranı yüksek olan diyet ile beslenenlerde kolorektal kanserin yarı yarıya daha az görüldüğü, yüksek oranda yağ alımının kolorektal kanser gelişimini kolaylaştırdığı görülmüştür. Hayvansal yağların yüksek oranda tüketimi, kırmızı etin balık eti ve beyaz ete göre daha fazla tercih edilmesi kolorektal kanser gelişiminde etkilidir. Yüksek miktarda vücuda alınan yağ, karaciğerde kolesterol ve safra asidi sentezini uyarır ve bu sayede sterollerin kolona geçişi artmaktadır. Kolon içerisinde yaşayan bakteriler sterol yapısındaki bu bileşikler sekonder safra asitlerine ve diğer toksik metabolitlere dönüştürürler. Serbest yağ asitleri ile safra asitleri muhtemelen ornitin dekarboksilaz ve siklooksijenaz enzimlerinin aktivitesini artırarak kolon epiteli üzerindeki hücre proliferasyonunu hızlandırmaktadır (Dobrucalı, 2003).

İnflamatuvar bağırsak hastalığı, gastrointestinal kanalın iltihaplanması yani inflamasyonu sonucu ortaya çıkar. Kronik ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olmak üzere iki adet formu bulunur (Şekil 1.4.).

Ülseratif kolit, kolonu rektumdan başlayarak proksimale kadar sağlam kısım bırakmadan tutan kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Crohn hastalığı ise ağızdan anüse kadar sindirim kanalı boyunca segmenter tarzda aralarda sağlam bölgeler bırakarak tutan kronik inflamatuvar bir hastalıktır (Griffiths vd., 2000). İnflamatuvar bağırsak hastalığı bulunan kişilerin kolonunda adenokarsinom oluşma riski daha fazladır. Bu hastalarda kolorektal kanser riski hastalığın süresi ve yaygınlığı ile doğru orantılı olarak artmaktadır.

Bu hastalarda kanserleşme oranı %3-8 arasındayken, hastalığın başlangıcından 10 yıl sonra %10, 25 yıl sonra ise %30 civarlarında seyretmektedir (Ekbom vd., 1990). Ülseratif koliti bulunan hastalarda, hastalığın başlangıcından itibaren 8. yıla ulaşmasıyla birlikte kolorektal kanser riski artmaya başlarken hastalığın 20. yılında bu risk oranı %25'e kadar çıkabilmektedir. 30 yıldan beridir bu hastalığa sahip pankolitli bireylerde kolorektal kanser gelişme riski ise %35 civarlarındadır (Dobrucalı, 2003). Bu anlamda hastalığın kolondaki yayılımı önemli bir faktördür. Crohn hastalığına sahip bireylerde kolorektal kanser gelişme riski normal topluma göre daha erken yaşlarda başlamaktadır.

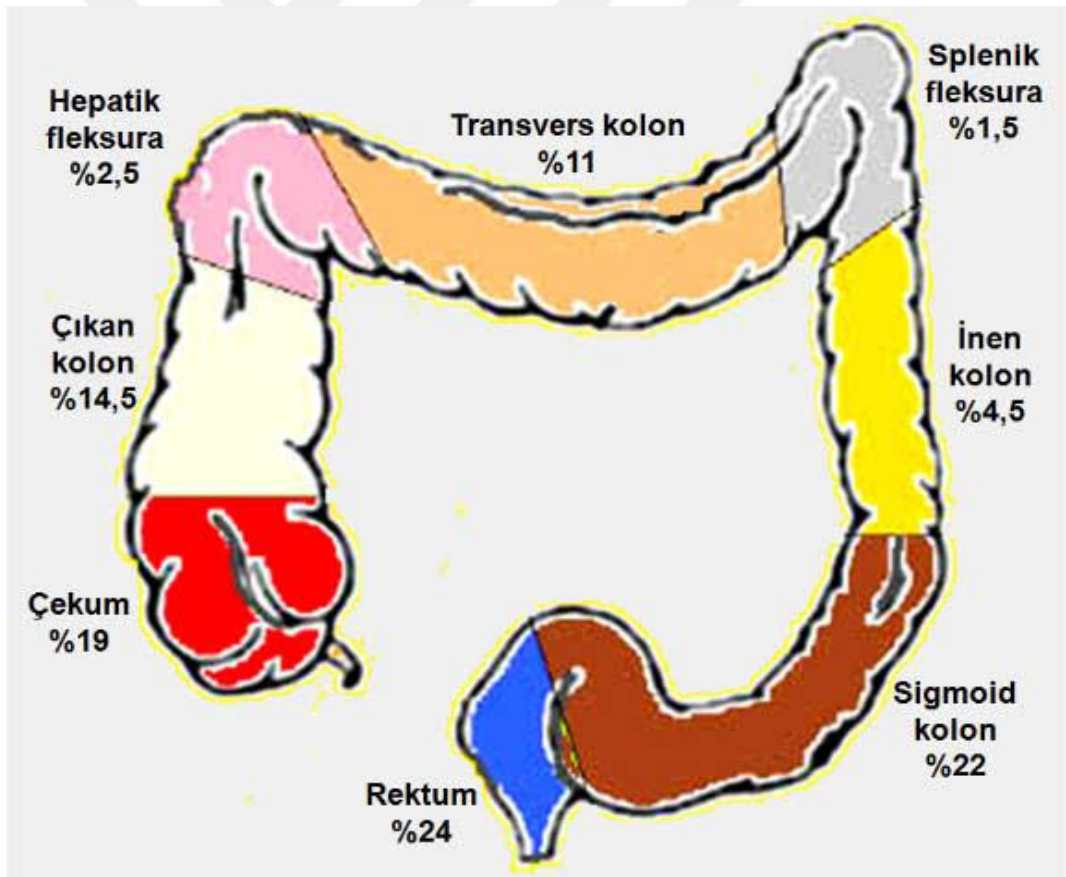


Şekil 1. 4. Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin kolon içerisindeki şematik gösterimi (Kumar ve Michell, 2010).

1.3. Kolorektal Kanserlerde Histopatoloji

Adenokarsinom ve müsinöz adenokarsinom tüm kanserlerin %90-95' ini oluşturur. Müsinöz adenokarsinomlar %15'lik oranla en yoğun olarak sağ kolonda görülürken %10 oranında da rektumda görülmektedir. Müsinöz adenokarsinomlarda tümör dokusunun %50'sinden fazla bir oranda hücre dışına atılan müsin gözlenmektedir (Hamilton ve Aaltonen, 2000).

Kolorektal kanserlerin büyük bir kısmı rektum ve sigmoid kolonda görülür. Kolorektal kanser riski düşük olan ülkelerde kolorektal kanser çekum ve çıkan kolonda daha fazla görülürken, kolorektal kanser riski fazla olan ülkelere ise rektosigmoid bölgede daha fazla görülür (Fenoglio vd., 1999; Christine vd., 2005).



Şekil 1. 5. Kolorektal kanserin kolon içerisindeki dağılımı (Dobrucalı, 2003).

Kolorektal tümörler %55-60 oranında rektosigmoid kolonda, %25 oranında inen kolonda, %5 oranında transvers kolonda, %15 oranında ise çıkan kolonda görülür (Şekil 1.5.). İlerleyen yaşlarda sağ kolon tümörleri daha sık görülmekle olup divertiküloz hastalığı ile birlikte seyretmektedir (Topuz ve Aykan, 1998). Kolorektal kanserlerde dünya sağlık örgütünün (WHO) histolojik tiplendirme ve sınıflandırılması Çizelge 1.1.'de verilmiştir.

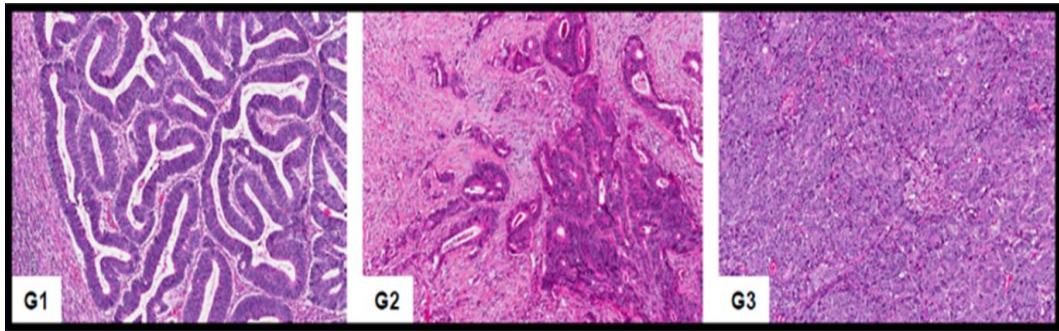
Çizelge 1. 1. Kolorektal kanserlerde dünya sağlık örgütünün (WHO) histolojik tiplendirme ve sınıflandırması (ICD-O: Uluslararası hastalık sınıflandırması-onkoloji).

Histolojik Tip	ICD-O Kodu	Tanım	Tümör Derecelendirme (G1-G4)	Düşük/Yüksek
Adenokarsinom	8140/3	Bez epiteli	1-3	D/Y
Müsinöz adenokarsinom	8480/4	%50'den fazla hücre dışı müsin yapımı	3	Y
Taşlı-yüzük hücreli karsinom	8490/3	%50'den fazla taşlı yüzük hücresi	3	Y
Yassı hücreli karsinom	8070/3	Büyük oranda yassı hücre diferansiyonu	1-3	D/Y
Adenoskuamoz karsinom	8560/3	Adenokarsinom ve yassı hücre karsinomun komponenti birlikte	1-3	D/Y
Medüller karsinom	8510/3	Büyük atipik malign hücre adaları çevresinde veya içinde çok belirgin lenfosit infiltrasyonu		
Diferansiye olmayan karsinom	8020/3	Farklılaşmaya işaret edecek özellik göstermeyen	4	Y

1.3.1. Adenokarsinom

Kolorektal kanserlerde kolon tümörlerinin yaklaşık olarak %90-95'i adenokarsinomlar oluştururlar. Adenokarsinomlar tümör hücrelerinin farklı boyut ve şekillerde adenoid yapılar oluşturması ile karakterizedir. Bu bağlamda adenokarsinomlar, adenoid oluşumu ve yaygınlığına bağlı olarak iyi diferansiye (grade 1), orta derecede diferansiye (grade 2) ve az diferansiye (grade 3) olmak üzere 3 grupta (Şekil 1.6.) sınıflandırılır (Hamilton ve Aaltonen, 2000). Bu sınıfların her biri ise grade olarak isimlendirilir. Bu gradelerin dışında nadiren de olsa sarkom ve lenfomalar gibi nonepitelyal tümörlerde görülebilmektedir (Küpelioğlu, 2004; Doğusoy, 2003). Gradeleme işlemi tümör dokusundaki tübül oluşumlarının dereceleri ve hücrel dizilimler baz alınarak yapılır. Kolorektal kanserli hastaların %15-20'si grade 1 ya da iyi diferansiye, %60-70'i grade 2 ya da orta derecede diferansiye, %15-20'si grade 3 ya da az diferansiye şeklindedir (Küpelioğlu, 2004).

Grade 1 karsinomlar mikroskopik olarak incelendiğinde adenoma epiteline benzerler, hücreler uniform tipte olup polarite kaybı minimal düzeydedir veya polarite kaybı yoktur (Kumar vd., 2000). Grade 2 karsinomlarda tübüler yapılar basit veya kompleks olabileceği gibi hafif düzensiz şekillidir. Polarite kaybı hafif veya orta düzeydedir. Grade 3 karsinomlarda ise glandüler ve tübüler yapılar tamamen ortadan kalkmış durumdadır ve polarite kaybı çok yüksektir (Bacon ve Eisenberg, 1971). Müsinöz karsinomlar ve taşlı yüzük hücreli karsinomlar grade 3 olarak kabul edilirler (Küpelioğlu, 2004). Histolojik gradelerin sağkalımda etkili olduğu belirlenmiştir (Sökmen, 2004).

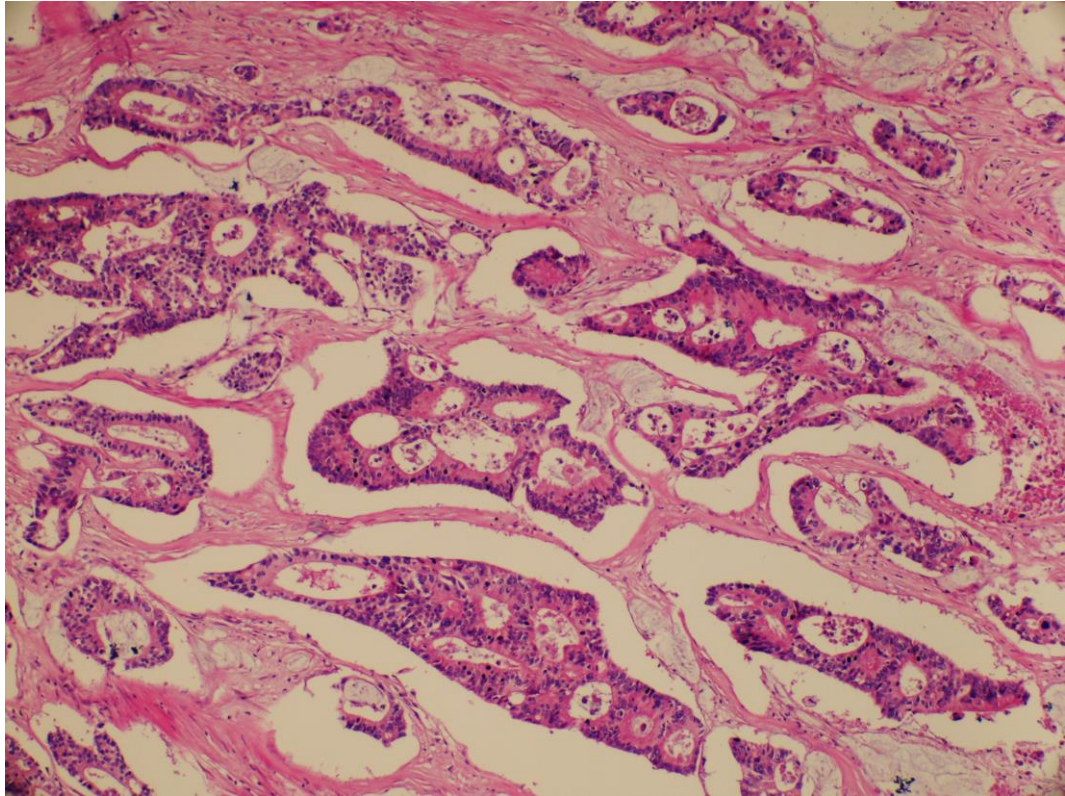


Şekil 1. 6. Kolorektal adenokarsinomlarda grade aşamaları (G1: Grade 1 (İyi diferansiye), G2: Grade 2 (Orta derece diferansiye), G3: Grade 3 (Az diferansiye)) (www.cancer.org).

1.3.2. Müsinöz adenokarsinom

Kolorektal kanserlerde müsinöz adenokarsinom, geniş bir alanda ekstraselüler olarak müsin sekresyonu gösteren tümör hücrelerinden meydana gelir (Şekil 1.7.). Müsinöz adenokarsinomda müsin sekresyonu ekstraselüler alanın en az %50'sini oluşturmaktadır.

Kolorektal kanserlerin yaklaşık olarak %15'ini müsinöz adenokarsinomlar oluşturur ve konvensiyonel adenokarsinomlara göre daha kötü prognoz göstermektedir. Müsinöz adenokarsinomlar daha çok rektumda görülür. Olguların bazılarında ekstraselüler alan dışında intraselüler alanda da müsin sekresyonu gözlenebilmektedir. Bu durum ise taşlı yüzük görünümlü hücre oluşumlarına neden olur (Hamilton vd., 2010; Kumar vd., 2010).

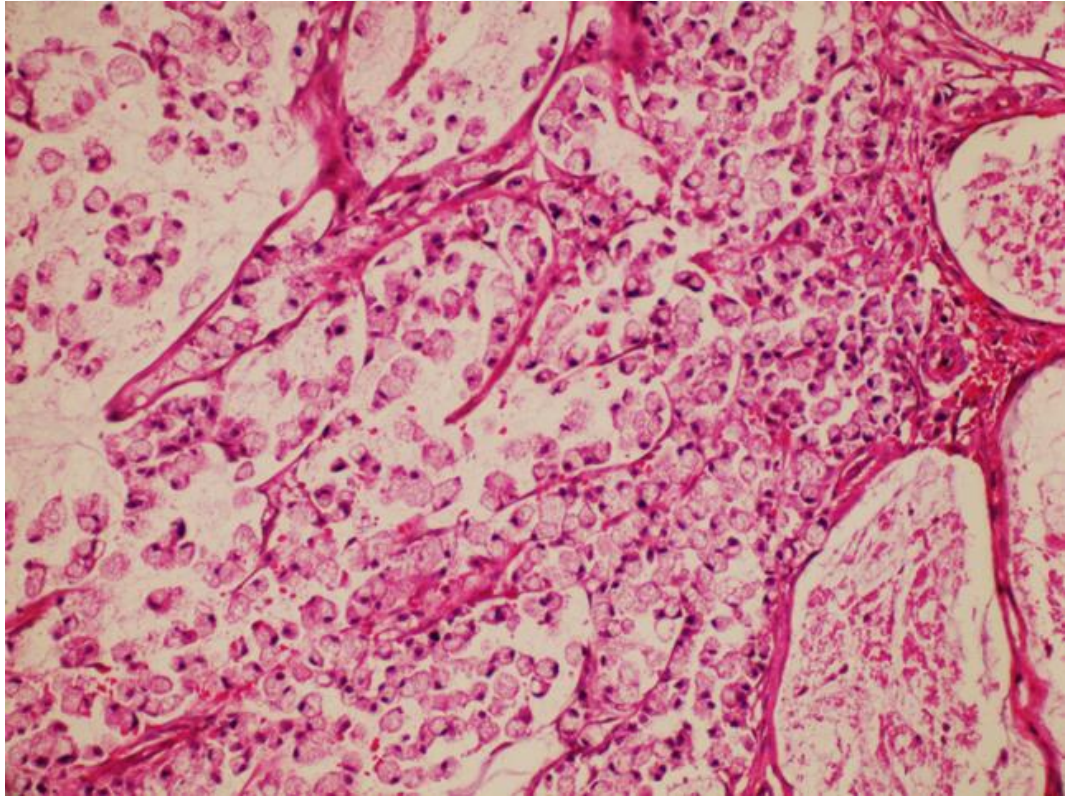


Şekil 1. 7. Müsinöz tipte adenokarsinomun histopatolojik görünümü.

1.3.3. Taşlı yüzük hücreli karsinom

Sitoplazma içerisinde fazla miktarda müsin birikimi hücre çekirdeğini merkezden hücre kenarına doğru iter. Bu durum sonucunda oluşan hücreler taşlı yüzük hücreleri olarak adlandırılır (Şekil 1.8.). Bu hücreler içerisinde müsin varlığı %50'den fazla bir miktardadır. Bu hücreler çoğunlukla gland oluşturmazlar ve diffüz yayılma gösterirler.

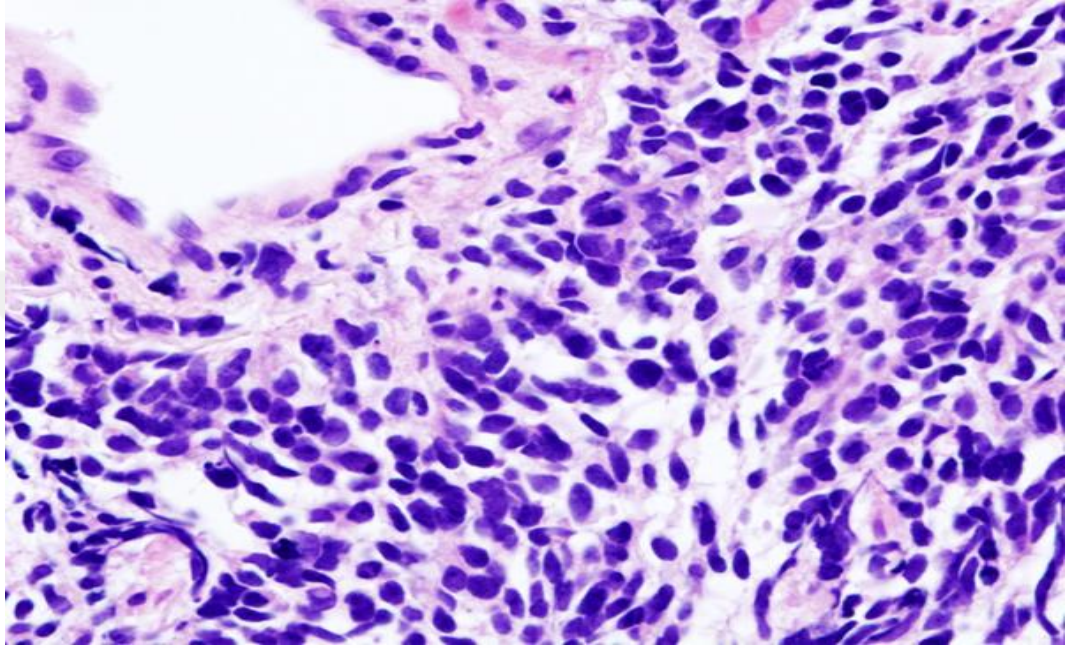
Taşlı yüzük hücreli karsinomlar, diğer tümörlere nazaran daha agresif ve daha kötü prognozudur. Peritoneal yüzey, lenf nodları ve overe metastaz yapma eğilimindedir (Jass, 2000). Nadir görülmelerine karşın genellikle genç yaştaki hastalarda görülürler. Müsinöz adenokarsinomlar ile taşlı yüzük hücreli adenokarsinomlar grade 3 yani az diferansiye olarak kabul edilirler.



Şekil 1. 8. Taşlı yüzük hücreli adenokarsinomun histopatolojik görünümü.

1.3.4. Küçük hücreli karsinomlar

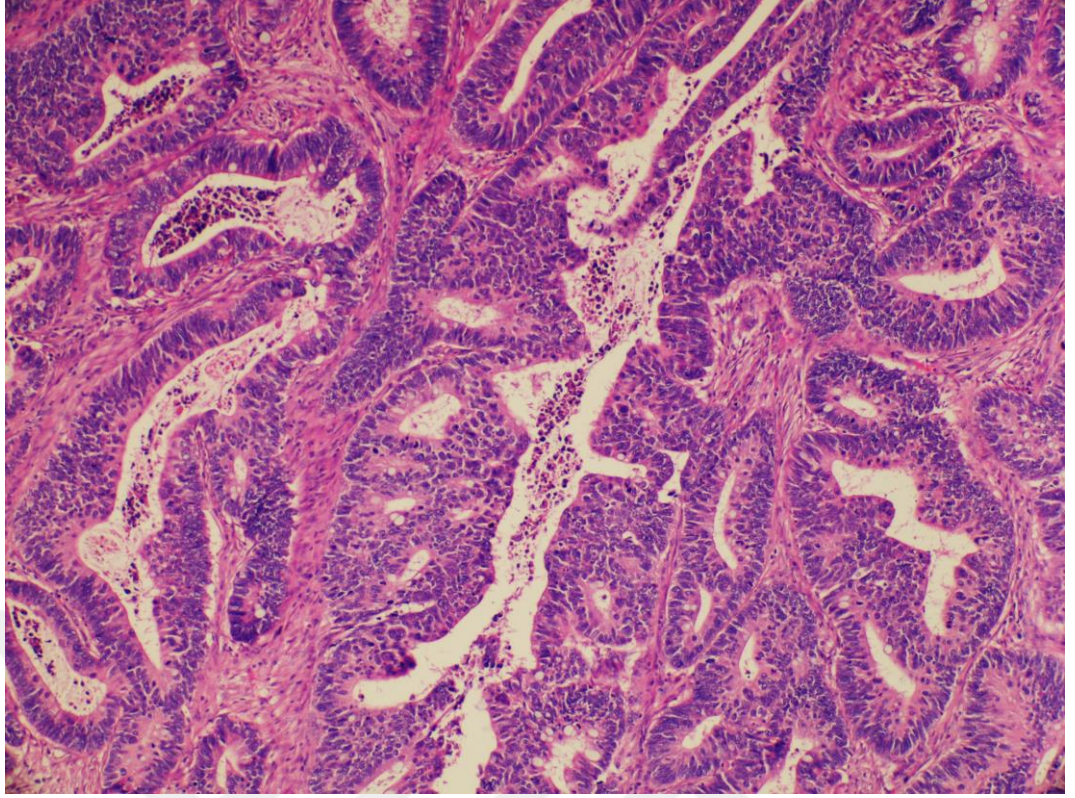
Küçük hücreli akciğer kanserinde olduğu gibi histopatolojik olarak kolorektal kanserde de aynı özellikleri taşıyan bir adenokarsinom tipidir. Küçük hücreli karsinomlar (Şekil 1.9.) kolorektal kanserde %1'den daha az bir oranda görülürler. Bu karsinom tipi kötü prognoz olmakla birlikte lenf nodu ve karaciğer metastazı göstermektedir.



Şekil 1. 9. Küçük hücreli karsinomun histopatolojik görünümü.

1.3.5. Undiferansiye karsinomlar

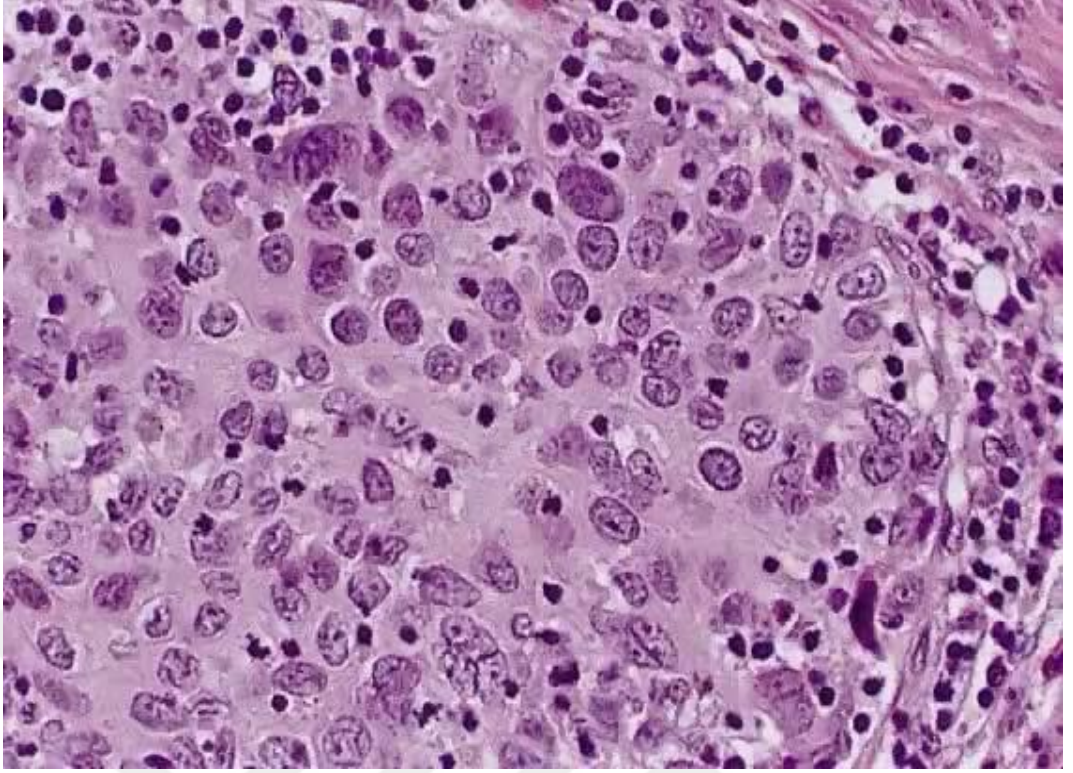
Tümörü meydana getiren hücreler glandüler ve daha az görülen diferansiye tümör hücrelerine benzemezler. Undiferansiye karsinomlar, kolorektal karsinomların yaklaşık %1'lik gibi bir kısmını oluştururlar. Bu karsinomdaki hücrelerin sınırları belirgin, tek dize şeklinde, orta veya küçük büyüklükte olup nukleusludur (Şekil 1.10.).



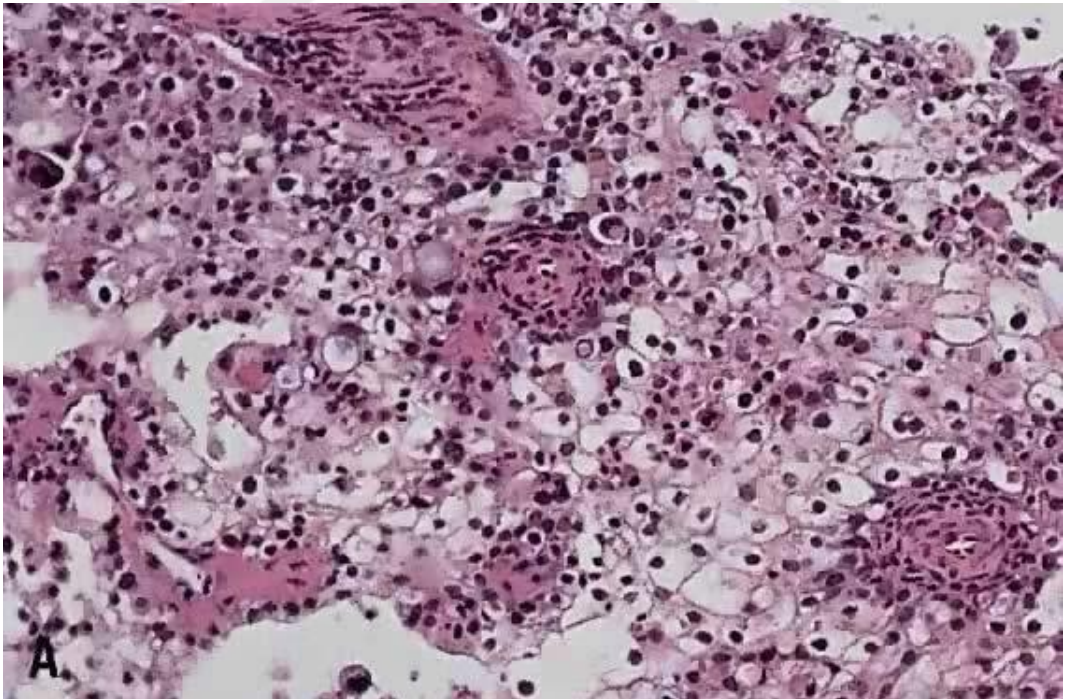
Şekil 1. 10. Undiferansiye karsinomun histopatolojik görünümü.

1.3.6. Skuamöz/adenoskuamöz karsinomlar

Nadir olarak görülen bir karsinom tipidir. Skuamöz (Şekil 1.11.) ve adenoskuamöz (Şekil 1.12.) hücreli tümörler, tüm kolorektal tümörlerinin %0.05-0.10'unu oluşturduğu düşünülmektedir (Smith vd., 1990). Adenoskuamöz hücreli karsinomlar kadın ve erkekte eşit oranlarda görülürken, skuamöz hücreli karsinomlar kadınlara oranla erkeklerde 2 kat daha fazla görülmektedir (Lafreniere ve Ketcham, 1985). Ülseratif kolit, radyasyon uygulanmış bağırsak, kolo-kutanöz fistül varlığı, schistosomiasis ve kolon duplikasyonları gibi durumlarda skuamöz hücreli karsinomlar daha sık görülmektedir (Beaton vd., 1981).



Şekil 1. 11. Skuamöz hücreli karsinomun histopatolojik görünümü.



Şekil 1. 12. Adenoskuamöz hücreli karsinomun histopatolojik görünümü.

1.4. Kolorektal Kanser Karsinogenezi

Kolorektal karsinogenez, kolon mukozası içerisinde aşırı hücre çoğalması ile polip oluşumlarını, bu poliplerin gelişimleriyle birlikte noninvaziv lezyonlara, daha sonrada invaziv ve yayılma (metastaz) özelliğine sahip tümör hücrelerine dönüşümlerini içerir. Kolorektal kanserler, normal dokularda büyüme ve gelişmeyi kontrol altında tutan moleküler mekanizmaların bozulmalarına yol açan genetiksel yapıdaki değişikliklerin birikimleri sonucunda oluşmaktadır. Kanserın moleküler temelının anlaşılması adına üzerinde en çok çalışma yapılan kanser türlerinden bir tanesi de kolorektal kanserdir ve bu kanser türünün heterojen ve çok karmaşık bir kanser modeli olduğu belirtilmiştir (Takayama vd., 2006). Karsinogenezdeki değişiklikler, hücre büyümesi ve apoptozis arasındaki dengeyi etkileyen ve histopatolojik incelemeler sonucunda tespit edilemeyen hassas ve önemli biyokimyasal olaylardan meydana gelmektedir.

Kolorektal karsinogenez, genetiksel yapıdaki birden fazla moleküler değişimin meydana getirdiği karmaşık bir karsinogenez modelidir. KRK gelişimi, diğer kanser türlerinde olduğu gibi düzenleyici genlerin fonksiyonları üzerindeki değişiklikler ve genomik kararsızlıkla ilişkilidir (Ashktorab vd., 2010). Epitel hücrelerinin neoplazik sürece girerek tümör oluşturabilmesi için gerekli olan genetik değişimler temel olarak iki mekanizma ile açıklanmıştır. Bu mekanizmalardan ilki, allelik kayıplar ve anöploidi ile karakterize olan kromozomal değişiklikler (genomic instability) iken ikincisi DNA yapısındaki bazı mutasyonlar sonucunda ortaya çıkan değişikliklerdir (microsatellite instability MSI). Genomik kararsızlık, yeterince mutasyona uğramış olan bir hücrenin tümör hücresine dönüşümüne uygun bir zemin oluşturarak adenom ve karsinom oluşumlarında önemli bir rol oynamaktadır.

Normal kolon mukozasında adenomatöz poliplerden kolorektal kansere dönüşüm 10 yıldan fazla bir sürede gerçekleşir. Adenomdan kolorektal karsinomaya dönüşüm sürecinde, genetik düzeydeki değişiklikler Fearon ve Vogelstein tarafından ortaya atılan çok basamaklı karsinogenez modeline uyum göstermektedir (Şekil 1.13.).

Vogelstein tarafından önerilen modele göre, genetik lezyonlardaki bir dizi birikim ile adenomdan karsinomaya geçiş, kolorektal kanserin temelini oluşturur ve biyolojik davranış ağırlıklı olarak mutasyon sayısına göre etkilenir. Araştırmacıların 1988 yılında öne sürdükleri bu model ile kolorektal kanser karsinogenezinde rol oynayan moleküler düzeydeki değişimlere yer verilmiştir. Bu modele göre,

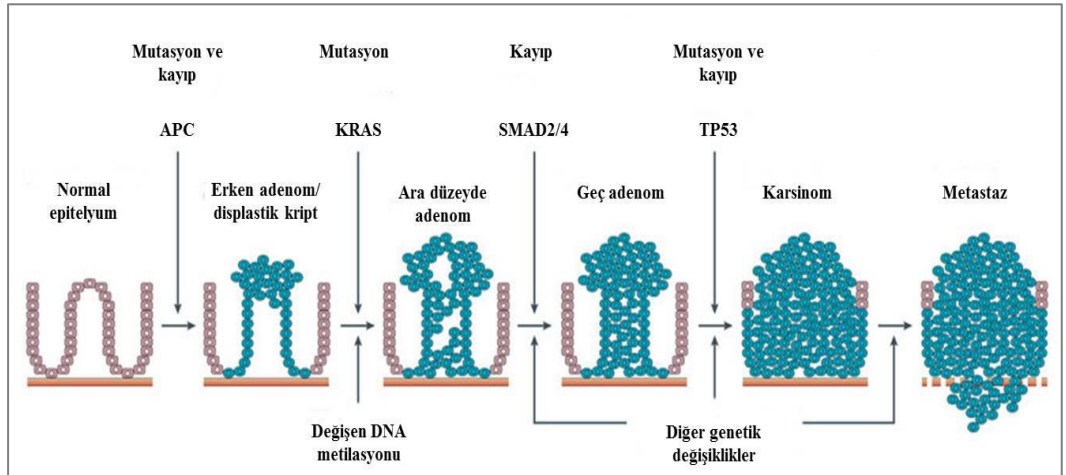
1- Kolorektal tümörler, onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin mutasyonel inaktivasyonu sonucunda meydana gelirler.

2- Malign yani kötü huylu tümör oluşumu için en az 4 veya 5 genin mutasyonu gerekir. Daha az sayıdaki mutasyonlar ancak benign yani iyi huylu tümör oluşumları ile sonuçlanır.

3- Genetik değişimlerin bir sıra içerisinde birbirini takip eden olaylar sonucu olduğu kabul görmekteyse de tümör yapılarının biyolojik özelliklerinin belirlenmesinde bu genetik değişimlerin birikimi, oluşum sırasından daha önemlidir.

4- Mutant yapıdaki bir tümör baskılayıcı gen, heterozigot bir ortamda bulunduğu bile fenotipik özelliğini gösterme gayreti içerisinde (Vogelstein vd., 1988).

Bu model bundan sonra yapılacak olan bilimsel çalışmalara ışık tutmakla birlikte özellikle Familial Adenomatous Polyposis (FAP) ve Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) gibi kolorektal kansere genetik yatkınlık oluşturan bu iki hastalığın aydınlatılmasını sağlamıştır.

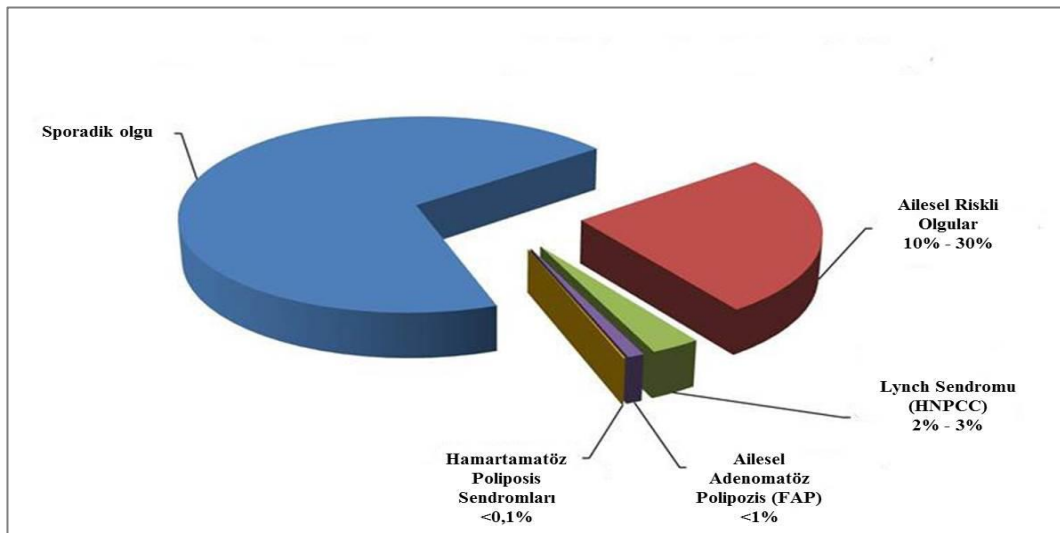


Şekil 1. 13. Kolorektal karsinogenezinde Vogelstein ve Fearon modeli (Vogelstein vd., 1988).

1.5. Kolorektal Kanser ve Genetik

Kolorektal kanserde genetik yapıdaki değişiklikler hastalığın fenotipini etkilemektedir. KRK'de genetik faktörler, adenomatöz polip oluşumunda, gelişiminde ve yayılmasında etkili rol oynamaktadır. Kolorektal kanserin genetik temelinin aydınlatılması adına çok sayıda moleküler genetik çalışma yapılmış ve hala daha yapılmaktadır. Kolorektal kanser gelişimi üzerinde etkili olan genetik faktörler hakkında yapılan çalışmalar sonucunda, %35 oranında bu faktörlerin kanser gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir (Lichtenstein vd., 2000).

Kolorektal kanserlerin yaklaşık olarak %15'i ailesel, %10'u kalıtsal ve %75'i ise sporadik (Şekil 1.14.) olarak oluşmaktadır (Lynch vd., 2006). Kolorektal kanserlerde yaklaşık olarak %25'lik gibi bir oran birinci derece akrabasında KRK öyküsü olan kişilerde görülmektedir (Hemminki ve Eng, 2004). Birinci ve ikinci derece akrabalarında KRK öyküsü olan bir kişinin sporadik olarak KRK'ye yakalanma riski yüksektir (Fuchs vd., 1994). Ayrıca 50 yaşından önce KRK tanısı alan hastaların birinci derece akrabalarında KRK'ye yakalanma riski daha da yüksektir. Olguların çoğunda kolorektal kanser bazı genlerdeki somatik mutasyonlar sonucunda oluşurlar. Bu mutasyonlar, gerçekleştiği genler ve bu genlerin moleküler mekanizması açısından farklılık gösterirler. Genetik açıdan riskli olan gruplar, ailesinde KRK öyküsü olan gruplar ile KRK tanısı almış bir kişinin yakınında bulunan gruplar kolorektal kanser gelişimine yatkın oldukları için sıkı takip edilmelidirler.



Şekil 1. 14. Kolorektal kanserde heterojenite (www.cancer.gov).

1.5.1. Ailesel adenomatöz polipozis (Familial Adenomatous Polyposis, FAP)

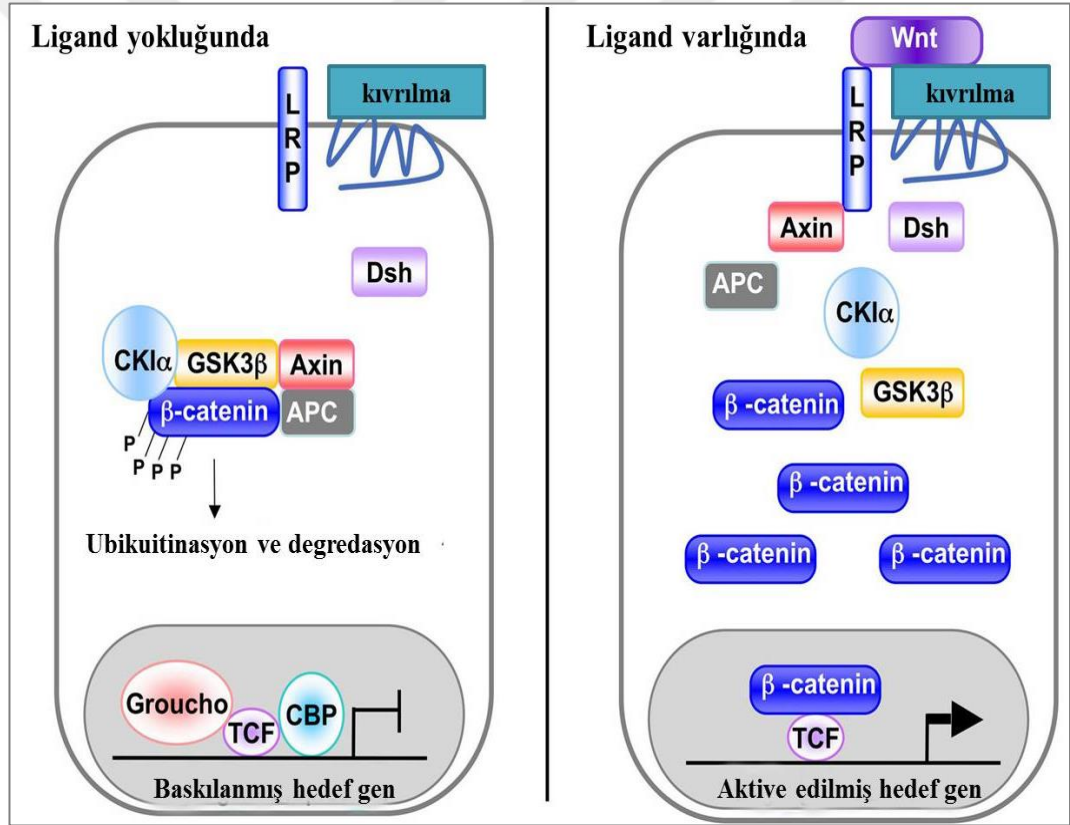
Tüm kolorektal kanserlerin yaklaşık olarak %1’lik gibi bir kısmını oluşturur. Otuzlu yaşlara kadar kolon içerisinde gelişen bu polipler cerrahi olarak çıkarılmaz ise %100 olarak kolorektal kanser gelişmektedir (Burt vd., 1995). Ailesel adenomatöz polipozis, otozomal dominant bir kalıtım gösterir. Kolon içerisinde yerleşmiş yüzlerce premalign adenomatöz polip ile karakterize bir hastalıktır (Rosai, 2004). Kolonda yerleşik olarak bulunan bu polipler normalde malign özellikler taşımazlar ancak sıklıkla bir veya birkaçı daha sonra invaziv kansere dönüşürler. FAP ile aynı özelliğe sahip, FAP’in varyantı olan Turcot, Gardner, Oldfield ve Peutz Sendromları’nda da kolon içerisinde yüzlerce sayıda adenomatöz polip oluşumu söz konusudur. Bu sendromlar ile birlikte gelişen kolorektal kanserler, sporadik kanserlere göre daha genç yaşlarda ortaya çıkmaktadır (Ahsan vd., 1998).

FAP, adenomatöz polipozis coli (APC) genindeki germ-line mutasyonlar sonucunda oluşan otozomal dominant geçişli bir hastalıktır ve klasik formunda 100 ile 1000 arasında kolorektal adenomatöz polip ile karakterizedir (Jung vd., 2016). Adenom gelişimi çocukluk ve ergenlik döneminde başlar, tedavi edilmediği takdirde ise malign forma dönüşür ve genellikle 35-36 yaş ortalaması ile kanser başlar (Scott vd., 2016). Kolorektal kanser hastalarında en sık ölüm nedeni FAP olup desmoid tümörler ikinci sıradadır. Kolorektal kanser gelişimini önlemek için FAP’li hastalarda kolorektal mukozanın profilaktik olarak çıkarılması önerilmektedir (Jung vd., 2016).

APC genindeki mutasyonlar FAP’in genetik temeli olarak bulunmuştur ve keşfedilmesinden bu yana 1500’den fazla patojenik mutasyon bildirilmiştir (Fokkema vd., 2011; Stenson vd., 2009). Bu mutasyonlar, kolon içerisindeki normal epitel hücrelerinde meydana gelir. FAP’li bireylerin yaklaşık %80-90’ında APC gen mutasyonu tanımlanmıştır. APC, çok işlevli bir tümör baskılayıcı protein olup bu gendeki mutasyonlar KRK ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Miyoshi vd., 1992; Powell vd., 1992). APC geni 5. kromozomun uzun kolunda 5q21 bölgesinde lokalizedir. APC geni Wnt sinyalizasyon yolağında görevli bir gen olup β -katenin adlı onkojenik göreve sahip proteinin düzenleyicisidir.

Wnt sinyalizasyon yolu (Şekil 1.15.) aktive olduğu zaman hücre proliferasyonu artarken inaktif olduğu zaman azalmaktadır. Plazma membranında Wnt ligand aktivasyonuna yanıt olarak, APC β -katenin kompleksini etkinleştirerek çekirdekte birikmesine neden olur. Bu durum hücre proliferasyonunu ve göçünü teşvik eden gen ağı aktivasyonuna yol açar (Yamulla vd., 2014).

β -katenin hücre çekirdeği içerisinde çeşitli transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek bazı genlerin aşırı ekspresyonu yol açar ve bunun sonucunda hücre büyüme ve bölünmesini tetikler. APC geninde meydana gelen mutasyonlar, bu genin Wnt sinyalizasyon yolağı üzerindeki düzenleyici etkisini ortadan kaldırır ve sonuç olarak düzensiz hücre büyümesi gerçekleşir. Bu sayede kolorektal kanser gelişimi hızlanmış olur.



Şekil 1. 15. Wnt/ β -katenin sinyalizasyon yolağı (www.wormbook.com).

1.5.2. Kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, HNPCC)

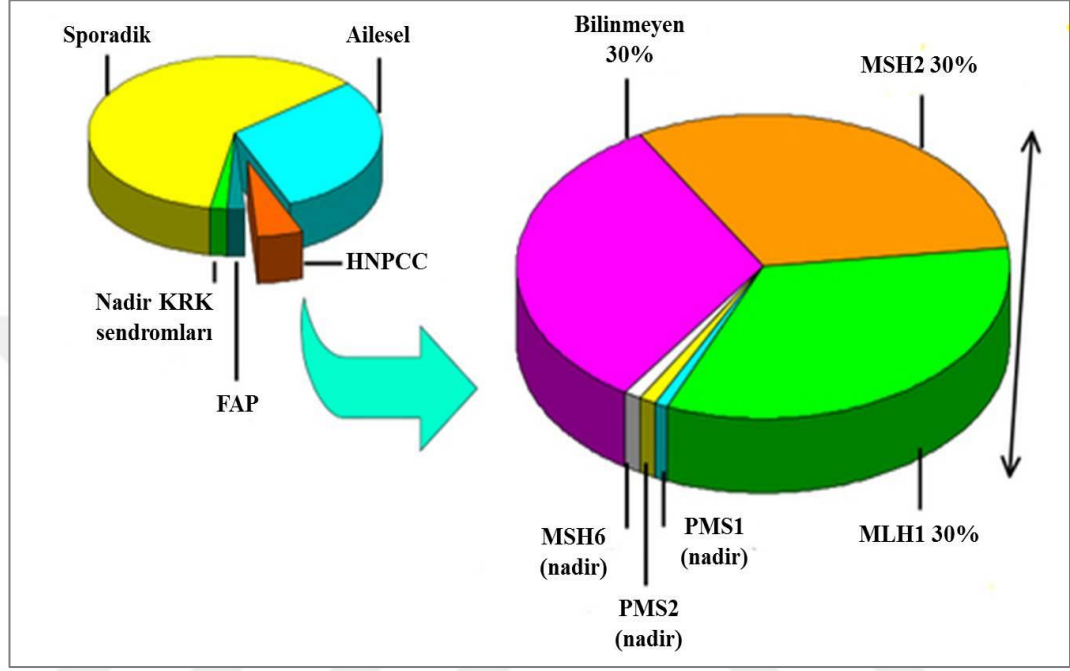
Kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser, literatürde Lynch Sendromu olarak da adlandırılmaktadır. HNPCC, tüm kolorektal kanserlerin %2-4'ünden sorumludur. HPCC de, FAP gibi otozomal kalıtım göstermektedir. Lynch sendromu, en sık olarak görülen kolorektal kanser sendromu olup, kanser vakalarının yaklaşık %3'ünden sorumludur (Hampel vd., 2008). Lynch sendromu, DNA tamir genlerindeki (MMR-Mismatch Repair) somatik mutasyonlar nedeniyle bazlar arasındaki yanlış eşleşmeler sonucunda oluşmaktadır (Stoffel ve Kastrinos, 2014).

Non-polipozis olmasının nedeni, HNPCC'li hastalarda kolon içerisinde en fazla 100 adet polip gözlenmesidir. Bu durum hastalığın erken yaşlardaki en önemli fenotipik özelliğidir. Bu polipler erken yaşlarda sağ veya proksimal kolonda yerleşmiş olarak bulunurlar. FAP'li bireyler kolon içerisinde yüzlerce adenomatöz polip bulunmasına rağmen HNPCC'li bireylerde bu sayı en fazla 100'dür. HNPCC'li hastalarda karsinom gelişiminin sebebi adenomatöz polipler değildir. Bu hastalarda kanser, DNA replikasyonu sırasında hayati öneme sahip olan DNA tamir genlerindeki mutasyonlar nedeniyle gelişmektedir (Şekil 1.16.). Bu mutasyonlar sonucunda DNA tamir mekanizmasında bozulmalar meydana gelir. Bu durumda DNA tamir sistemi işlevini yerine getiremez, bu da MSI sonucuna neden olur. Temel unsur MMR genlerindeki mutasyonlar iken, kanser gelişiminin nedeni MSI'dır (Büyükdoğan, 2009). Bu genler, replikasyon sırasında yanlış eşleşmiş baz çiftlerini tespit ederek, yanlış eklenen bazları zincirden koparır ve yerine doğru bazları ekleyerek onarım işlemi yapmaktadır. Mutasyonlar sonucu HNPCC'ye neden olan başlıca DNA tamir genleri; MLH1, MSH2, MLH3, MSH6, PMS1, PMS2 ve TGBR2 genleridir. Bu genlerdeki mutasyonlar sonucunda gelişen HNPCC otozomal olarak yeni nesillere kalıtılmaktadır.

Lynch Sendromu'nun 2 alt grubu bulunmaktadır. Bunlar;

Lynch I: Kolon dışı tutulum yoktur. Tümör genellikle erken yaşlarda (ortalama 45) başlar ve %70 oranında proksimal kolona tutunmuş durumdadır.

Lynch II: Kolon dışı tutulum gösteren bir tümör grubuna sahiptir. Başta endometrium, over, üreter/renal pelvis, mide, ince bağırsak, hepatobiliyer sistem olmak üzere kolon dışı tutulum göstermektedir (Hamilton vd., 2000). HNPCC, sporadik kansere göre daha erken yaşlarda ortaya çıkar ve bu yaş grubu erkeklerde ortalama 39 iken kadınlarda ortalama 37'dir (Fenoglio vd., 1999).



Şekil 1. 16. HNPCC'ye neden olan DNA tamir genlerindeki mutasyonlar ve yaklaşık oranları (Burt., 2000).

1.6. PIK3CA (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha)

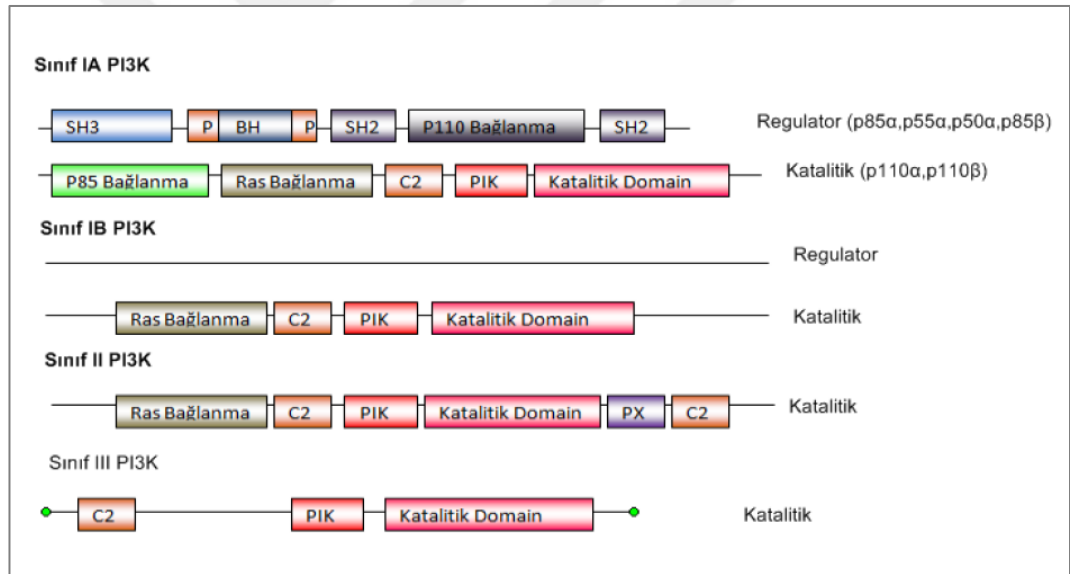
1.6.1. PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)

Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) hücre proliferasyon, yayılma ve hayatta kalması için sinyal yollarının başlatılmasında kritik bir lipid kinazdır. Sınıf IA fosfatidilinositol 3-kinazlar, heterodimerik bir lipid kinaz ailesi olup farklı reseptör tirozin kinazlara (RTK) bir dizi yanıt olacak şekilde hücre içerisindeki birçok süreci düzenler (Hamilton vd., 2000). PI3K'ların hem lipid hem de protein kinaz aktiviteleri bulunmaktadır. PI3K'lar hücre proliferasyonu, hayatta kalması, metabolizması ve motilitesi dahil olmak üzere çeşitli hücresel fonksiyonları düzenlemektedir (Foukas vd., 2006). Fosfatidilinositol 3-kinazlar, p110 α katalitik alt birimi ile p85 düzenleyici alt biriminden meydana gelen lipid kinazlardır (Vanhaesebroeck ve Waterfield, 1999). PI3K'nın katalitik alt birimi olan p110 α , hücre içerisinde hücresel büyüme sinyallerini aktarmasıyla çok önemli bir role sahiptir (Foukas vd., 2006). Aynı modüler protein-protein etkileşimi alanları p85 ve aktive edilmiş reseptör tirozin kinazlara bağlı p110 α bağlantılıdır (Escobedo vd., 1991). PI3K/ AKT sinyalizasyon yolu, çeşitli reseptör tirozin kinazlar için EGFR, FGFR gibi genler içermektedir. Bunun yanında RAS gen ailesi, PIK3CA, p85, PTEN, PDK1/2, AKT ve mTOR gibi efektör genlerde içermektedir. PI3K'lar, birden fazla alt birimden oluşurlar ve izoformları ile üç sınıfa ayrılan büyük ve karmaşık bir aileden meydana gelirler (Fruman vd., 1998; Vanhaesebroeck vd., 2001). PI3K'lar, fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfat (PI(3,4,5)P₃) üretilmesinden sorumludur ve bu serin treonin kinaz AKT aktivasyonu için gereklidir. Bu mekanizma hangi hücrenin hayatta kalacağını belirleyebilen önemli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir (Osaki vd., 2004).

Memeli hücrelerinde PI3K'nın üç sınıfa ayrılan çoklu izoformları bulunmaktadır (Şekil 1.17.). Sınıf I PI3K'lar, yapıları ve aktivasyon durumları göz önünde bulundurulduğunda Sınıf IA ve Sınıf IB şeklinde iki alt gruba ayrılmaktadırlar.

Sınıf IA enzimleri regülatör alt birim; p85 α , p85 β , p85 γ ve intron kesim varyantları p55 α ve p50 α ile katalitik alt birim; p110 α , p110 β ya da p110 γ 'nın heterodimerleridir. Sınıf IA PI3K'lar, heterodimerik bir yapıya sahip olup p110 α katalitik alt birimi ile p85 düzenleyici adaptör alt birimlerinden meydana gelirler. Katalitik alt birimlerin p110 α , p110 β , p110 δ ve p110 γ şeklinde 4 adet izoformu bulunmaktadır. Sınıf IA PI3K'lar öncelikle hücre içerisinde tirozin kinaz aktivitesi olan reseptörlerin, o biyokimyasal yolaktaki sinyallerini düzenlemek ve reseptörlerle ilişkili olmayan tirozin kinazlara bağlanmakla ilişkilendirilmişlerdir (Ikenoue vd., 2005; Velho vd., 2005).

PI3K'lar literatürde yapılan çalışmalar sonucunda uzun süredir kanser ile ilişkilendirilmektedirler. Bu ilişki ilk olarak, Rous sarkoma virüsündeki Src proteinini ve polyoma virüsündeki T protein gibi iki onkoproteinin fosfatidilinositol kinaz aktivitesi göstermesidir (Vogt vd., 2007).

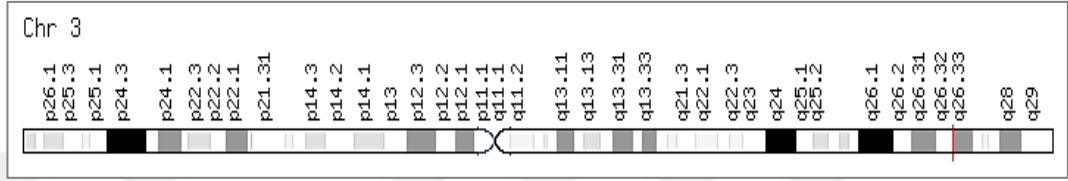


Şekil 1. 17. PI3K izoformları (Engelman ve Cantley, 2006).

1.6.2. PIK3CA (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha) Geni

PIK3CA geni, fosfatidilinositol 3- kinazın (PI3K) katalitik alt ünitesini yani p110 α proteinini kodlayan önemli bir gendir (Şekil 1.19.).

Bu gen 3. kromozomun uzun kolunun 26.3 bölgesinde lokalizedir (Şekil 1.18.). PIK3CA geni 21 ekzondan oluşur ve 1068 amino asitten oluşan 124kDa'luk p110 α proteinini kodlar. Aynı zamanda PI3K'nın katalitik alt birimi olan p110 α izoformu, p85'in bağlanabileceği bir N-terminal adaptör-bağlanma domaini (ABD), bir RAS bağlanma domaini (RBD), bir protein kinaz- C homoloji-2 (C2), bir helikal domain ve bir C-terminal kinaz domaini içerir. p110 α katalitik alt birimi, Sınıf IA PI3K izoformlarından biridir ve p85 düzenleyici alt birimi ile birlikte sinyal iletiminde önemli bir role sahiptir (Kang vd., 2006; Cantley, 2002).



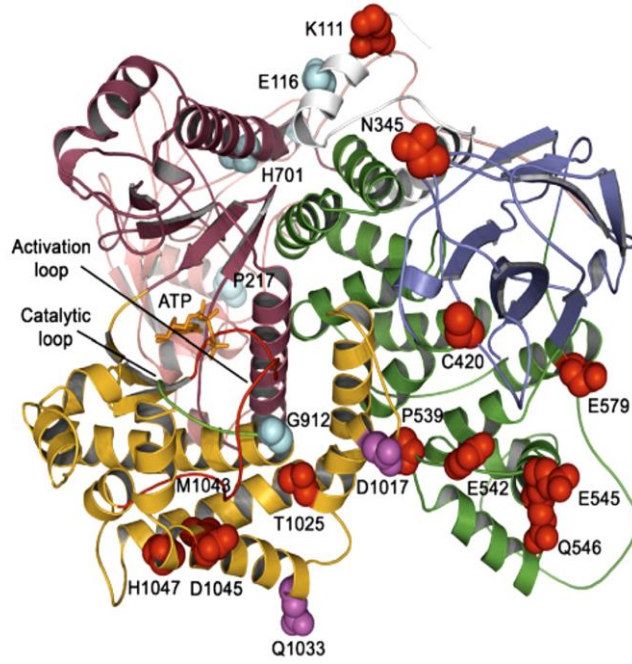
Şekil 1. 18. PIK3CA geninin 3.kromozom üzerindeki lokalizasyonu (www.genecards.org).

Kolon, meme, beyin, akciğer, karaciğer ve mide gibi birçok kanser türünde PIK3CA genine ait birçok gen amplifikasyonu, delesyonu ve somatik mutasyonu tanımlanmıştır (Karaks vd., 2006). Yakın bir zamanda Iwabuchi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada yumurtalık kanserlerinin %30'nda, PIK3CA'nın bulunduğu 3q26 kromozomal bölgesindeki DNA kopya sayısında artış görüldüğü bildirilmiştir (Iwabuchi vd., 1995). PIK3CA'nın baş ve boyun, prostat, üriner sistem, serviks, meme ve endometrium kanser tiplerinde %30 oranında mutasyona uğradığı bildirilmiştir (Zhao ve Vogt, 2008). PIK3CA mutasyonlarından en bilinenleri, helikal ve kinaz domainindeki SNP (Single Nucleotide Polymorphism) yani tekli nükleotid değişimleridir.

Birçok raporda PIK3CA geni üzerinde exon 9 ve exon 20 bölgelerindeki hotspot mutasyon bölgeleri bildirilmiştir (Samuels ve Ericson, 2006). p85 düzenleyici alt birim exon 1 tarafından kodlanmaktadır. Upstream sinyallerinin olmaması durumunda, düzenleyici alt birim p85, p110 α 'nın stabilitesini ve katalitik aktivitesini bastırmaktadır (Samuels ve Ericson, 2006). p110 α C-terminal kinaz exon 20 tarafından kodlanır ve bu alandaki mutasyonlar enzimatik aktiviteyi uyarabilmektedir.

p110 α helikal domaini ise exon 9 tarafından kodlanmaktadır ve bu alandaki mutasyonlar p110 α katalitik alt birim ve p85 N-terminal SRC Homoloji-2 (SH2) etki alanı arasında önleyici etkileşimleri zayıflatır (Vogt vd., 2007; Zhao ve Vogt, 2008; Huang vd., 2007). ABD, C2, helikal ve kinaz alan mutasyonları literatürde bildirilmiştir (Vogt vd., 2007).

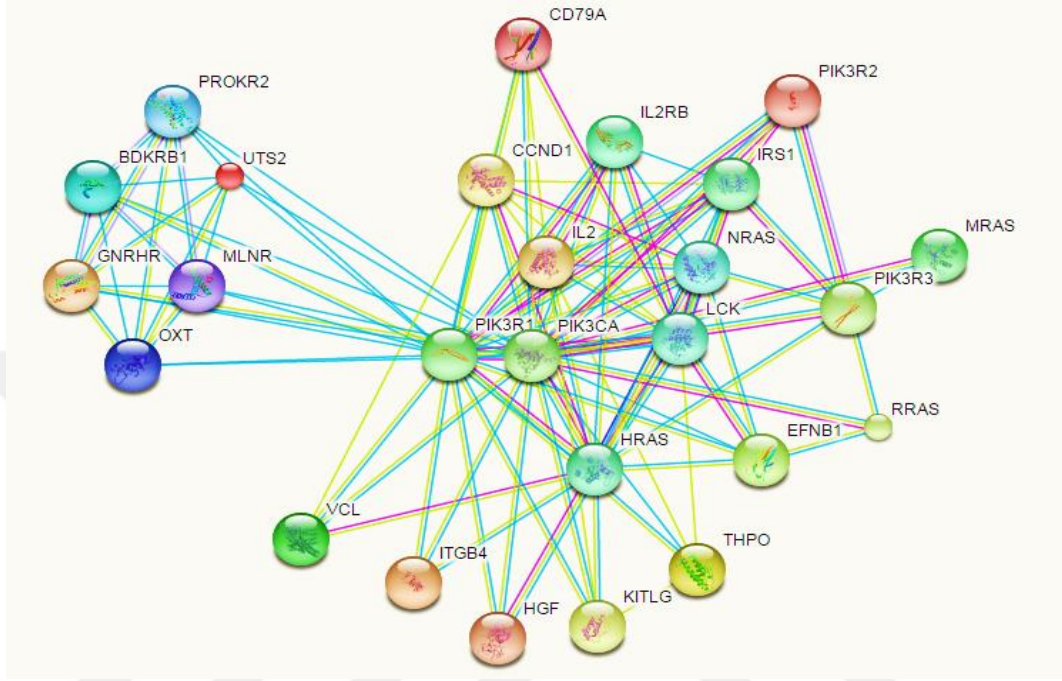
Samuels ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda çeşitli tümör örneklerinden PIK3CA geninin tam dizisi çıkartılmış ve bu gene ait somatik mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar sıklıkla exon 9 (helikal domain) ve exon 20 (kinaz domain) bölgesinde olduğunu belirtmişlerdir (Şekil 1.20.). Yapılan çalışma sonucunda 74 kolorektal kanserin %32'sinde, 15 gliblastomanın %27'sinde, 12 mide kanserinin %12'sinde, 12 meme kanserinin %8'inde, 24 akciğer kanserinin %4'ünde PIK3CA somatik mutasyonlarını tanımlamışlardır (Samuels vd., 2004). PIK3CA geninin etkileşim içinde olduğu diğer genler Şekil 1.21.'de verilmiştir.



Şekil 1. 19. PIK3CA (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha) (Whyte ve Holbeck, 2006).



Şekil 1. 20. p110a protein domainleri (Samuels vd., 2004).



Şekil 1. 21. PIK3CA ile etkileşim içerisinde olan diğer genler (www.genecard.org).

1.6.3. PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyon yolağı

Tümör hücrelerinde sinyal iletimi çoğunlukla sitoplazmik kinazları etkileyen reseptör tirozin kinazların aktivasyonunu içermektedir. Kanser gelişiminde önemli olduğu bilinen üç büyük sinyalizasyon yolağı arasında PI3K/AKT kinaz zinciri, protein kinaz C ailesi (PKC) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK/Ras) sinyalizasyon yolakları bulunmaktadır.

Hüresel sinyal iletiminde önemli bir role sahip olan PI3K/AKT sinyalizasyon yolağı (Şekil 1.22.), reseptör tirozin kinazlar ile yakın ilişki içerisinde. Damar endoteli büyüme faktörü (VEGF) reseptörü (VEGFR), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) reseptör a, epidermal büyüme faktörü (EGFR), c-Met gibi çeşitli tipteki reseptör tirozin kinazlar tümör hücrelerinden salınabilmektedir.

Bu reseptör tirozin kinazlar tümör hücrelerinin fonksiyonlarını şekillendirmede PI3K/AKT sinyalizasyon yolağını kullanmaktadırlar (Faivre vd., 2006).

RTK aktivasyonu bu reseptörlerin sitoplazmik tirozin rezidülerinin otofosforilasyonuna yani kendi kendine fosfat eklemesine neden olmaktadır. Daha sonra fosfat eklenen bu bölgelere çeşitli adaptör proteinleri bağlanarak oluşan sinyalin hücre içerisine iletilmesini sağlarlar. Adaptör proteinlerin ortak özelliği ise Src homoloji-2 (SH2) bölgeleri içermesidir. Adaptör proteinler SH2 bölgeleri vasıtası ile reseptörlere bağlanarak, reseptör tirozin kinazlar ile sitoplazma içerisindeki efektör proteinler arasında bir köprü oluşturur (Doğan ve Güç, 2004). Otofosforilasyon sonrasında PI3K'nın düzenleyici alt birimi olan p85 proteini aktive olur. Bu aktivasyon işlemi insülin reseptör substratları (IRS1-2) vasıtasıyla indirekt olarak da yapılabilmektedir (Wysocki, 2009). p85 proteininin aktivasyonu sonrasında PI3K'nın katalitik alt birimi olan p110 proteini plazma membranında fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PIP2)'ı fosfatidilinositol-3,4,5-fosfat (PIP3)'a çevirir.

PIP2, PIP3 bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktive edilmesinde görev alır. PKB'nin diğer adı AKT proteindir ve bu protein PI3K'nın hedef proteini olarak bilinir. Fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) PIP3'ü defosforile ederek PI3K'nın negatif yönde kontrol edilmesini sağlamaktadır.

AKT serin treonin kinaz, hücre membranında fosfatidilinositol-3 bağımlı kinaz 1 (PDK1) tarafından fosforile edilerek aktive olur (Bellacosa vd., 1998). AKT hücre çoğalması, büyümesi, transkripsiyonu, göçü ve apoptozis gibi birçok olayda sinyal iletiminden sorumlu olan önemli bir serin treonin kinazdır. Protein kinaz B AKT1 ve AKT2 genleri tarafından kodlanmaktadır. AKT'nin aşağı sinyal yolu efektörlerinden (downstream effectors) en önemlisi mTOR (mammalian target of rapamycin)'dur. mTOR, fosfatidilinositol 3- kinaz (PI3K)'nin aktivasyonu ile sinyal iletiminde önemli bir göreve sahip bir kinaz proteini olup PI3K/AKT sinyal yolağının önemli bir bileşenidir (Hay, 2005). Çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler PI3K ve AKT yolunu aktive ederek hücrel döngüler için yaşama sinyalleri oluştururlar.

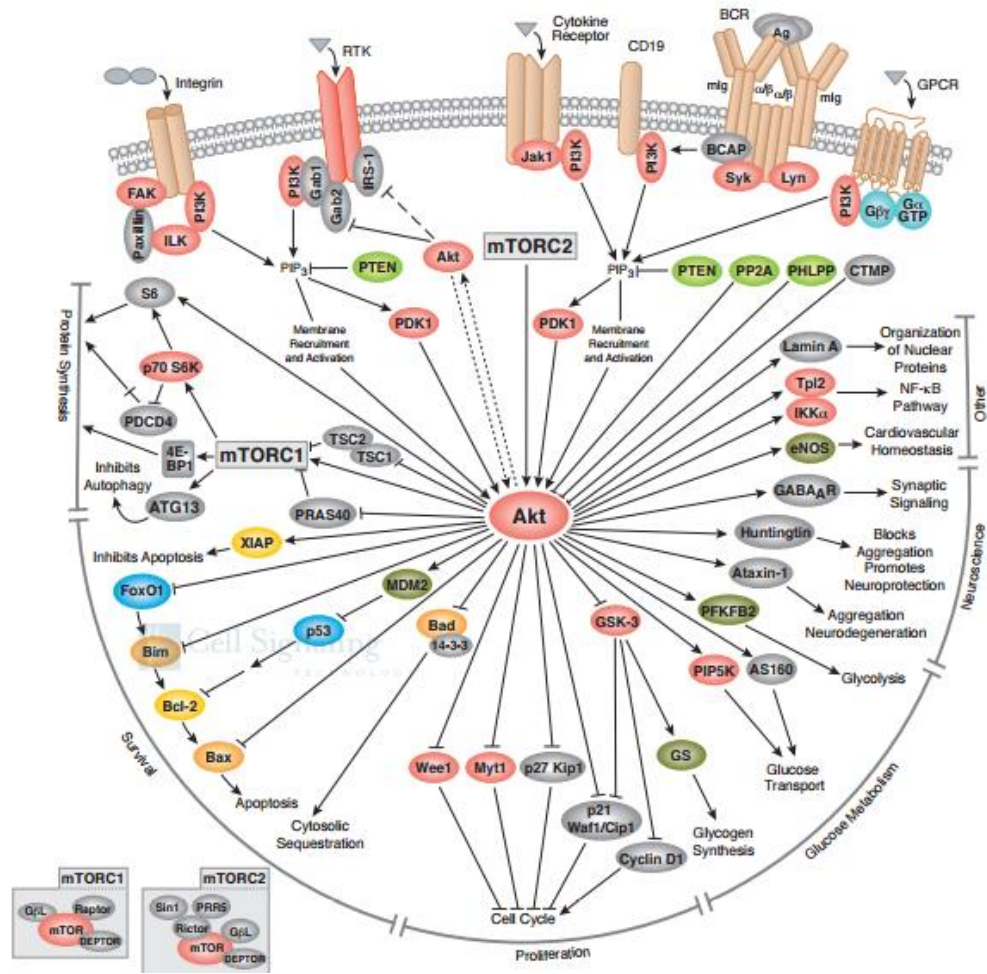
AKT aktivasyonu sonrasında, AKT plazma membranından ayrılarak mTOR'u fosforilasyonla aktive ettiği sitoplazmaya ve oradan da çekirdeğe doğru hareket eder.

mTOR aktivasyonu doğrudan hücre büyümesini etkilemektedir (Engelman ve Cantley, 2006).

PI3K/AKT sinyalizasyon yolağı aktive edildikten sonra apoptozis, artan hücre proliferasyonu, geliştirilmiş anjiyogenez ve tümör hücrelerinin hızlandırılmış göçünün inhibisyonuna katkıda bulunmuştur (Hennessy vd., 2005). PI3K/AKT sinyalizasyon yolağı, normal hücre fonksiyonlarının yerine getirilmesinde çok önemli bir role sahiptir. Bu sinyal iletim yolunun farklı bölgelerindeki fonksiyon kayıpları insan kanserlerinin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin Shukla ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma sonucunda, PI3K/AKT sinyalizasyon yolağının anormal derecedeki aktivasyonu artan hücre invazyonuna katkıda bulunmuş ve prostat kanseri ilerlemesini kolaylaştırmıştır.

Karsinogenezde önemli bir etkiye sahip olan PI3K/AKT sinyalizasyon yolağının kanser gelişimine etkisinde, bu yolaktaki çeşitli değişimlerin katkısı olduğu savunulmaktadır. Bu değişimlerden bazıları şu şekilde sıralanmıştır:

- 1- PI3K'nın sentezi artabilir.
- 2- Tümör baskılayıcı bir protein olan PTEN, mutasyon ile fonksiyon kaybına uğrayabilir.
- 3- Protein Kinaz B (PKB) diğer adıyla AKT proteininin sentezi çeşitli kanser hücrelerinde (meme, prostat, kolon, over, mide) artabilir.
- 4- PTEN proteinindeki işlevsel kayıplar veya PKB'nin hücrede aşırı miktarda ifade edilmesi sürekli olarak mTOR aktivasyonuna neden olmaktadır (Doğan ve Güç, 2004).



Şekil 1. 22. PI3K/AKT/mTOR Sinyalizasyon yolağı (www.keyword.com).

1.7. DNA Dizileme Yöntemleri

DNA dizi analizi diğer bir adıyla sekanslama işlemi, moleküler bir teknik olup DNA'daki nükleotid dizilerinin belirlenmesi amacıyla kullanılır. Bu teknikle birlikte, bir DNA molekülüne ait nükleotid bazlarının (adenin, timin, sitozin, guanin) sırası belirlenebilmektedir. Sekanslama tekniği temel biyoloji, biyoteknoloji, adli tıp, moleküler biyoloji, genetik ve daha pek çok alanda sıklıkla kullanılmaktadır. Sekanslama teknolojisi ile birlikte birçok araştırma ve proje yapılmış, bu sayede insan genom projesi kapsamında tüm insan genomunun dizisi saptanmış ve ayrıca benzer projelerle birlikte çok sayıda hayvan, bitki, mantar ve bakteri genomunun tam dizisi çıkarılmıştır.

Analiz işlemi, bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanmaktadır. Bu hibridizasyon işlemi sırasında radyoaktif maddelerle veya floresan boylarla işaretleme yapılabilir. Sekanslama işlemi, genetik mutasyonların (insersiyonu, delesyonu vs.) belirlenmesinde, rekombinant DNA oluşumlarının tayininde günümüzde yoğun olarak kullanılmaktadır. Preimplantasyon tanısı, genetik hastalıkların tayininde sıklıkla kullanılmaktadır. Kalıtsal hastalık taşıyan çiftlerin tüp bebek embriyolarından alınan DNA'lar dizileme yöntemleri ile analiz edilerek taşıyıcı olan embriyoların elenerek taşıyıcı olmayanların doğması sağlanabilmektedir. Ayrıca doku uygunluğu saptanan embriyoların, sağlıklı olarak doğacak olanlarından elde edilen kordon kanı ve kemik iliği hasta kardeşlerinin tedavisinde kullanılabilmektedir.

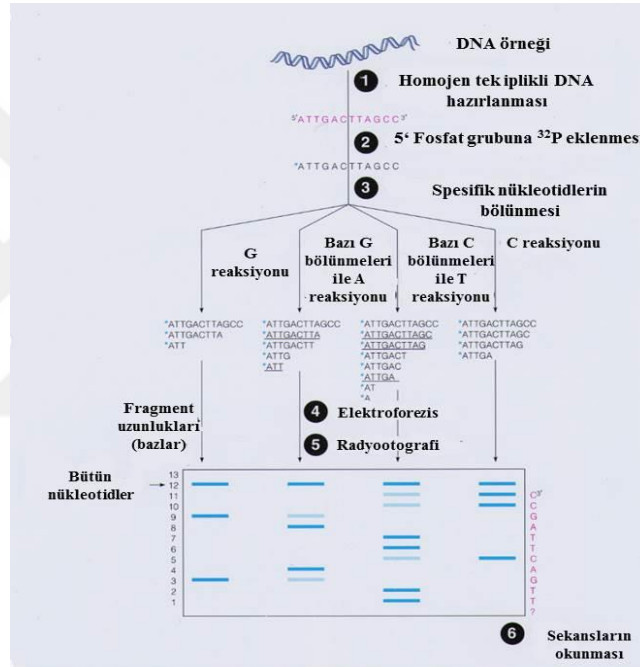
1970'li yılların başlarından iki önemli DNA dizileme tekniği geliştirilmiştir. Bunlardan ilki Maxam ve Gilbert'in 1973 yılında geliştirdiği dizileme yöntemi iken, diğeri ise 1975 yılında Sanger ve Coulson'ın geliştirdiği zincir sonlandırma yöntemleridir (Gilbert ve Maxam, 1973; Sanger ve Coulson, 1975).

1.7.1. Maxam-Gilbert DNA dizileme yöntemi

Allan Maxam ve Walter Gilbert tarafından Harvard Üniversitesi'nde geliştirilen bu DNA dizilime yöntemi, DNA'nın kimyasal olarak modifikasyonu ve ardından spesifik bazlardan kesilmesi esasına dayanmaktadır (Maxam ve Gilbert, 1977). Bu yöntemde, dizisi çıkarılacak olan DNA fragmentinin çift ipliği birbirinden ayrılarak, sadece bir ipliği kalıp olarak kullanılmaktadır. Yöntem, DNA'nın 5' ucunun polinükleotid kinaz enzimi kullanılarak ³²P ile radyoaktif olarak işaretlenmesi ve ardından da sekanslanacak olan DNA fragmanının saflaştırılması aşamalarını içermektedir. Bu aşamadan sonra dört farklı kimyasal reaksiyon (G, A+G, C, C+T) karışımı hazırlanır.

Uygulanan kimyasal işlemlerle birlikte moleküllerin küçük bir kısmında, DNA'yı meydana getiren bazlardan bir veya ikisinde kesikler meydana gelmektedir. Daha sonra bu modifiye DNA fragmanları sıcak piperidin ile birlikte modifiye olmuş bazların pozisyonunda kesilir.

Modifikasyon işleminde kullanılan kimyasalların konsantrasyonları ayarlanarak her bir DNA molekülü başına ortalama bir modifikasyon olması sağlanır. Sonuç olarak 5' ucundan bir radyoaktif ile işaretli ve diğer ucunda kesik yeri bulunan moleküler ağırlıkları birbirinden farklı bir fragman havuzu oluşur. Dört reaksiyon sonucunda oluşturulan fragman havuzları daha sonra moleküler ağırlıklarına göre ayrılacakları bir poliakrilamid jel üzerinde yan yana paralel olarak kuyulara yüklenerek, bir elektriksel alan (elektroforez) içerisinde koşturular (Şekil 1.23.). Her bir DNA fragmenti 5' ucundan bir radyoaktif ile işaretli olduğundan dolayı, jel bir filmin üzerinde otoradyografi yöntemi kullanılarak görselleştirilir ve bu sayede bantlar görünür hale getirilerek DNA dizisi belirlenir (Öner, 2002).

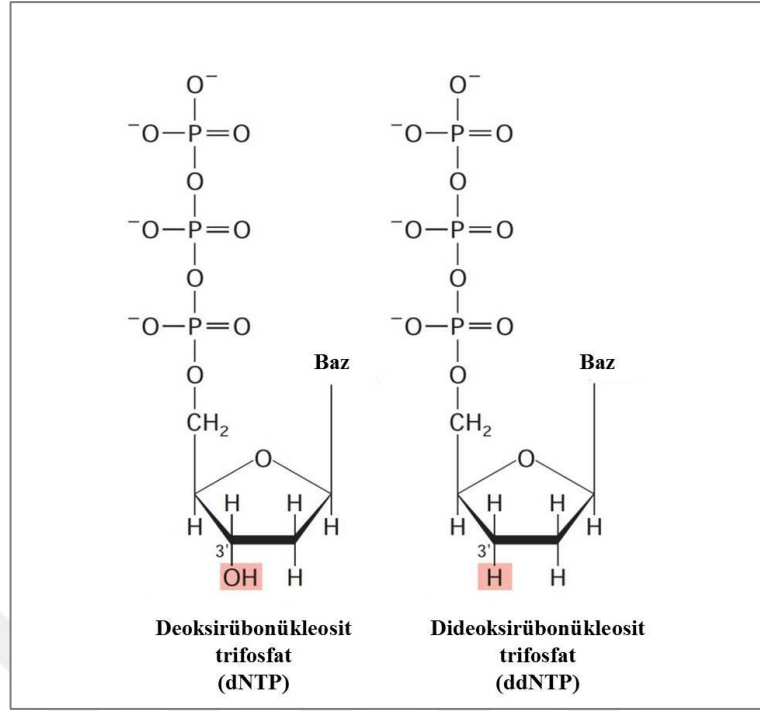


Şekil 1. 23. Maxam-Gilbert DNA dizileme yönteminin şematik görünümü (Maxam ve Gilbert, 1977).

1.7.2. Sanger sekanslama yöntemi

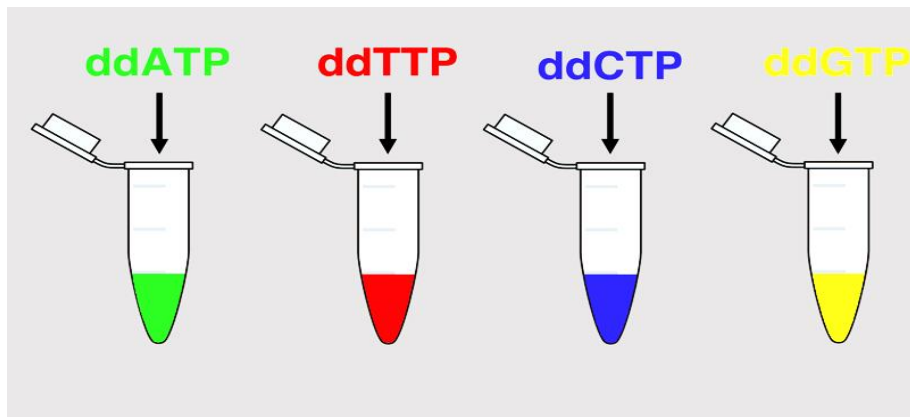
Sanger ve Coulson tarafından geliştirilen bu DNA dizileme yönteminde, belirli bir bazda sonlanan DNA zincir sentezi gerçekleştirilmektedir. Bundan dolayı bu yöntemin adı zincir sonlandırma yöntemi olarak da adlandırılmaktadır. Bu teknik, Maxam ve Gilbert'in geliştirdiği yöntemle kıyasla daha verimli, daha az toksik kimyasal ve radyoaktif madde gerektirdiğinden dolayı kısa süre içerisinde kullanımı hızla yaygınlaşmıştır. Sanger yönteminde temel kural, zincir sonlandırıcı olarak dideoksinükleotid trifosfatların (ddNTP) kullanılmasıdır.

Sanger sekanslama metodunda, bir adet tek zincirli kalıp DNA, bir adet DNA primeri, zincir uzamasını sağlayan bir DNA Polimeraz enzimi, deoksinükleotid trifosfatların (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) yanında bir de dideoksinükleotid trifosfatlar (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) kullanılmaktadır (Şekil 1.24.). Kullanılan ddNTP'ler çeşitli sekans cihazlarında otomatik olarak tespit edilebilmek amacıyla radyoaktif veya floresan olarak işaretlenmektedir. ddNTP'lerin normal dNTP'lerden farkı ise 3' ucunda bir oksijen (O) atomunun olmamasıdır. Normal DNA sentezinde, dNTP'ler DNA Polimeraz tarafından zincire eklenerek zincir uzaması sağlanır. Bu uzama işlemi, bir dNTP'nin 3' ucundaki hidroksil (OH) grubuyla diğer dNTP'nin 5' ucundaki fosfat (P) grubu arasındaki fosfodiester bağı oluşturmaları sayesinde gerçekleşir. ddNTP'lerin ise 3' ucundaki bir oksijen atomunun eksikliği bu bağı oluşmasını engeller ve bu sayede sentezlenen zincire eklenen bir ddNTP zincir sentezini durdurur.



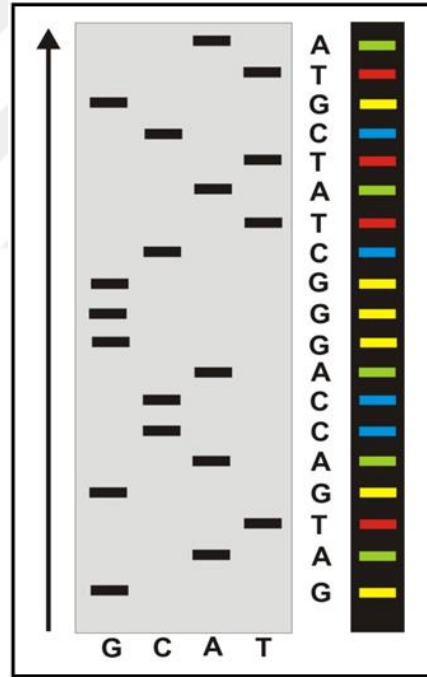
Şekil 1. 24. dNTP ve ddNTP'lerin biyokimyasal yapıları.

Bu zincir sonlandırma reaksiyonu için, öncelikle dizisi saptanması istenen bir DNA ipliği kalıp olarak kullanılır. Daha sonra içerisinde bu kalıp DNA'nın bulunduğu dört adet reaksiyon karışımı hazırlanır (Şekil 1.25.). Hazırlanan her bir karışımın içerisinde, bir kalıp DNA, primer, dNTP'lerin dördü ve ddNTP'lerden sadece bir tanesi bulunur. Zincir sonlanması için hazırlanan dört reaksiyon tüpünün her birinin içerisinde ddNTP'lerden sadece bir tanesi bulunur.



Şekil 1. 25. Sanger sekanslama için hazırlanan dört farklı ddNTP reaksiyonunun şematik görünümü.

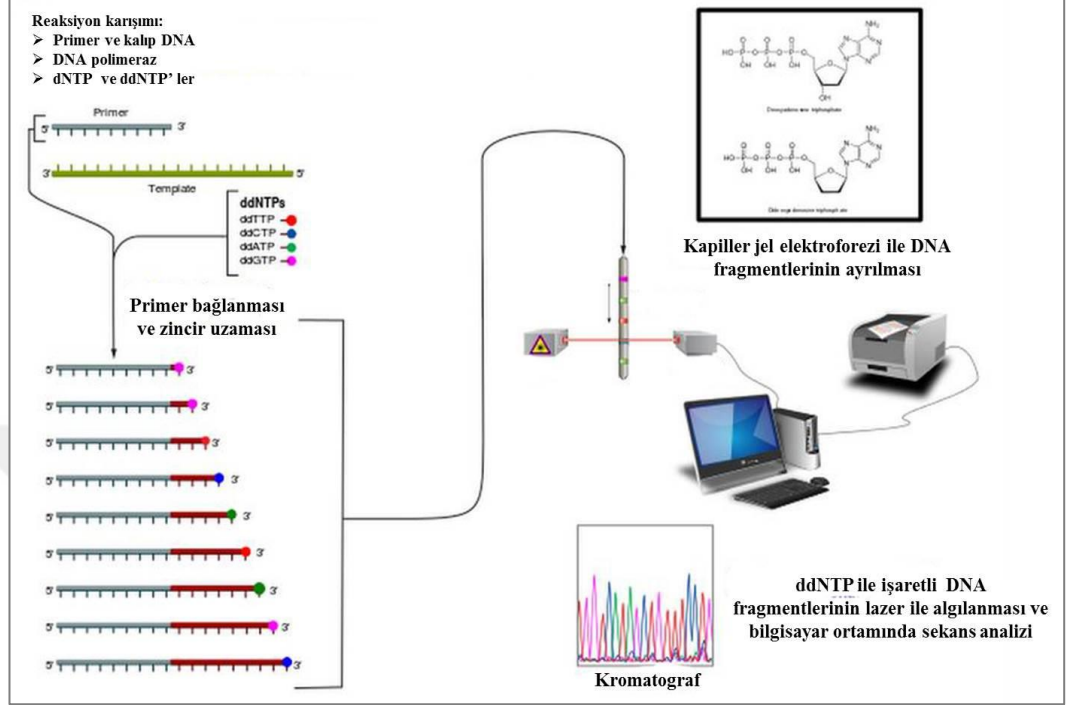
Daha sonra oluşturulan her bir reaksiyon tüpü için PCR yapılır. Bu PCR işlemi normal bir şekilde ön denatürasyon, denatürasyon, bağlanma, uzama ve sonlanma basamaklarından oluşan belirli sayıdaki döngünün tekrarlanmasıyla gerçekleştirilir. PCR işleminden sonra her bir reaksiyon tüpü içerisinde ortamdaki ddNTP'ler tarafından oluşturulan farklı uzunluklarda çok sayıda DNA fragmenti bulunur. Daha sonra bu fragmentleri içeren reaksiyon karışımları bir poliakrilamid jel üzerinde paralel olarak dört farklı kuyuya yüklenir ve bir elektriksel alan içerisinde (elektroforez) koşturulurlar. Moleküler ağırlığı küçük olan DNA fragmentleri jelde daha hızlı koşarken moleküler ağırlığı yüksek olanlar daha yavaş koşarlar. Elektroforez sonrası poliakrilamid jel otoradyografi ile görselleştirilir ve DNA bantları görünür hale getirilir (Şekil 1.26.). Daha sonra bu bantların moleküler ağırlıkları göz önünde bulundurularak aşağıdan yukarıya doğru okunur ve DNA dizisi saptanır.



Şekil 1. 26. Sanger sekanslama sonrası şematik poliakrilamid jel görünümü ve dizileme.

Günümüzde DNA dizi analizi için; elektroforez yerine otomatik cihazlar ve radyoaktif izotoplar yerine de floresan boyalar kullanılmaktadır (Öner, 2002). Bu sayede sekans reaksiyonları ayrı ayrı hazırlanmak yerine tek bir tüpte hazırlanabilmektedir.

Sistem, üzerindeki lazer ışığı sayesinde ile farklı özellikteki floresan boyaları algılar ve her bir nükleotid için ayrı renkte pikler oluşturarak nükleotid dizisini belirler (Şekil 1.27.).



Şekil 1. 27. Otomatize sistemler ile Sanger sekanslama işleminin şematik görünümü.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu tez çalışması kapsamında, Muğla bölgesinde yaşayan ve Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne gelen, kolorektal kanser tanısı almış hastaların parafin bloklara gömülü (FFPE) kolon doku örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca bu çalışma için Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Etik Kurulu Başkanlığı tarafından çalışmanın yapılabilmesi adına onay alınmıştır.

Tez çalışmasına dahil edilen kolorektal kanser hastalarına ait kolon doku blokları Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı'nın verdiği sonuçlar doğrultusunda patoloji uzmanlarının da yardımlarıyla birlikte yaş, cinsiyet, kanserleşme evresi, histolojik tip, metastaz durumu gibi tüm klinikopatolojik parametreler, patoloji raporları göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Patoloji laboratuvarında, hastalara ait lam örnekleri teker teker mikroskop altında incelenerek çalışma için en ideal doku kasetleri tespit edilmiş ve çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışma kapsamında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı'nın doku arşivi ve verileri kullanılarak 2012 ve 2016 yılları arasında hastaneye gelerek kolorektal kanser tanısı almış hastalara ait kolon doku blokları seçilmiştir. Çalışma grubu olarak; 30 adet kolorektal kanserli tümör grubu, 20 adet tümör kontrol grubu ve 30 adet de normal kontrol grubu olmak üzere toplamda 80 adet hastaya ait doku örneği kullanılmıştır. Kolorektal kanserli hasta grubunun tamamı adenokarsinom tanısı almıştır. Tümör grubunda yer alan hastaların 20 tanesine ait sağlıklı kolon dokusu da tümör kontrol grubu adı altında kullanılmıştır. Bu grupta yer alan kolon doku örneklerinde herhangi bir kanserleşme olmadığından dolayı hasta kontrolü olarak kullanılmıştır. Normal kontrol grubunda ise tümör dışı sebeplerle (trafik kazası, demir eksikliği, tarama vb.) araştırılan hastaların kolon biyopsi materyalleri kullanılmıştır.

Çalışma için seçilen 80 adet parafine gömülü doku bloğundan mikrotom ile 3-5 µm çapında yaklaşık 20 mg kesit alınmış ve steril ependorf tüplerine aktarılmıştır. Tüplere alınan örneklerin her biri için bir kod verilip etiketlenmiştir. Tümör grubu örneklerine T1'den başlayarak T30'a kadar, tümör kontrol grubu örneklerine TC1'den başlayarak TC20'ye kadar, kontrol grubu örneklerine ise C1'den başlayarak C30'a kadar kod verilip etiketlenmiştir. Daha sonra tüm parafine gömülü doku blokları DNA izolasyonu için hazır hale getirilmiştir.

2.2. Parafine Gömülü (FFPE) Doku Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen 80 adet olguya ait parafine gömülü olan yaklaşık 20 mg doku örneklerinden genomik DNA izolasyon işlemi QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Kat No: 56404, Qiagen, Germany) ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.1. QIAamp DNA FFPE Tissue Kit DNA izolasyon protokolü

Daha önceden steril ependorf tüplerine alınan parafine gömülü doku kesitlerinden genomik DNA izolasyonu için aşağıdaki protokol uygulanmıştır. Tüplere deparafinizasyon amacı ile, 1 ml ticari olarak satılan Ksilen (C_8H_{10} , Birpa Kimya) eklenir ve parafin homojen olana kadar vortekslenir. Tüpler 14000 rpm' de 2 dakika santrifüj edilir ve süpernatant kısmı pellete değmeden dikkatli bir şekilde mikropipet yardımı ile uzaklaştırılır. Ksilen'i uzaklaştırma işlemi için tüplere öncelikle 1 ml % 50'lik etanol eklenir ve kuvvetlice vorteks yapılır. Tüpler 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir ve süpernatant kısmı pellete değmeden dikkatli bir şekilde mikropipet yardımı ile uzaklaştırılır. Tüplere 1 ml % 60'lık etanol eklenir ve kuvvetlice vorteks yapılır. Tüpler 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir ve süpernatant kısmı pellete değmeden dikkatli bir şekilde mikropipet yardımı ile uzaklaştırılır. Tüplere 1 ml % 70'lik etanol eklenir ve kuvvetlice vorteks yapılır. Tüpler 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir ve süpernatant kısmı pellete değmeden dikkatli bir şekilde mikropipet yardımı ile uzaklaştırılır. Tüplere 1 ml % 80'lik etanol eklenir ve kuvvetlice vorteks yapılır.

Tüpler 14000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir ve süpernatant kısmı pellete değmeden dikkatli bir şekilde mikropipet yardımı ile uzaklaştırılır. Tüplere son olarak 1 ml % 96’lık etanol eklenir ve kuvvetlice vorteks yapılır. Tüpler 14000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir ve süpernatant kısmı pellete değmeden dikkatli bir şekilde mikropipet yardımı ile uzaklaştırılır. Bu sayede ortam ksilenden arındırılmış olur. Tüpler 15-20 dakika içerisindeki etanol uçuna kadar oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyon işleminden sonra tüplere 180 µl Buffer ATL ve 25 µl Proteinaz-K eklenir ve kuvvetlice vorteks yapılır. Tüpler daha önceden 56°C’ye ayarlanmış olan ısı bloğunda 1 gün boyunca inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra ısı bloğunun sıcaklığı 90°C’ye çıkarılır ve tüpler bu sıcaklıkta 1 saat daha inkübe edilir. Tüplere kısa bir santrifüj (spin-down) işlemi yapılır. Daha sonra üzerlerine 200 µl Buffer AL ve 200 µl % 96’lık etanol eklenir. Tüpler 10 saniye kadar vortekslenir ve kısa bir spin-down yapılır. Parçalanmış hücre lizatları spin column tüplerine mikropipet yardımı ile aktarılır ve tüpler 9000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir. Spin column tüplerinin altındaki toplama tüpleri atılır ve spin columnlar yeni toplama tüplerine yerleştirilir. Tüplere 500 µl Buffer AW1 eklenir ve 9000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir. Spin column tüplerinin altındaki toplama tüpleri atılır ve spin columnlar yeni toplama tüplerine yerleştirilir. Tüplere 500 µl Buffer AW2 eklenir ve 9000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir. Spin column tüplerinin altındaki toplama tüpleri atılır ve spin columnlar yeni toplama tüplerine yerleştirilir. Boş tüpler 14000 rpm’de 4 dakika santrifüj edilir. Spin columnlar 1,5 ml’lik steril ependorf tüplerine yerleştirilir ve spin columnların tam ortasından 50 µl Buffer ATE tüplere eklenir. Tüpler 1 dakika kadar oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 14000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir. Bu işlem ile birlikte parafine gömülü doku örneklerinden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen genomik DNA’ların saflık ve konsantrasyon değerleri nanodrop (Maestrogen, Taiwan) ile A230, A260 ve A280 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ayrıca DNA izolasyon sonucunu görebilmek için örnekler % 0,8’lik agaroz jele 3 µl şeklinde yüklenerek sonuçlar gözlemlenmiştir. DNA örnekleri ilerideki deneylerde kullanılmak üzere -20°C’ye kaldırılmıştır.

2.3. İzole Edilen Genomik DNA'ların Nanodrop ile Konsantrasyon ve Saflık Derecelerinin Ölçülmesi

İzole edilen genomik DNA'ların konsantrasyon ve saflık dereceleri nanodrop (Maestrogen, Taiwan) cihazı ile A230, A260 ve A280 nm dalga boylarında ölçülmüştür.

Ölçme işlemi öncesinde nanodrop cihazı açılmış ve DNA örneklerinin yerleştirileceği elmas kısmı DNaz/RNaz- free su ve steril kurutma kağıdı yardımıyla temizlenmiştir. Cihazın 'Select sample' kısmından ölçümü yapılacak olan materyal seçilmiştir. Genomik DNA' lar çift iplikli olduğu için bu kısımda 'dsDNA' seçimi yapılmıştır. Daha sonra DNA izolasyon kısmının son aşamasında DNA hangi solüsyon ile elüe edilmiş ise o solüsyondan (Buffer ATE) 2 µl mikropipet ile çekilerek cihazın ölçüm yapan elmas kısmına koyulmuş ve elmas ünitesi kapatılmıştır. Cihazın 'start measurement' kısmında 'blank' sekmesi seçilmiştir. Bu işlem DNA ölçümü öncesi cihazı sıfırlamak için yapılmıştır. Bu sayede sıfırlama işlemi tamamlanmıştır.

Sıfırlama işleminden sonra elmas ünitesi tekrar açılmış ve elmas kısmında kalan dH₂O steril kurutma kağıdı ile iyice temizlenmiştir. Daha sonra genomik DNA örneklerinden 2 µl mikropipet ile çekilerek cihazın ölçüm yapan elmas kısmına koyulmuş, elmas ünitesi kapatılmış ve 'sample measuring (dsDNA)' sekmesi seçilmiştir. Her DNA ölçümünden sonra elmas, dH₂O ve steril kurutma kağıdı ile silinmiştir. Bu işlemden sonra diğer DNA örneklerinin de ölçme işlemi yapılmıştır. Bu sayede genomik DNA'ların konsantrasyonları ve saflık dereceleri A230, A260 ve A280 nm dalga boylarında ölçülmüştür.

Tüm genomik DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık dereceleri bir liste halinde kayıt edilmiştir.

2.4. Genomik DNA'ların Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

İzole edilen genomik DNA'ları ultraviyole (UV) ışık altında görünür hale getirebilmek için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Bunun için öncelikle %0,8'lik bir agaroz jel hazırlanmıştır. 1,6 gram agaroz (Sigma) hassas terazi ile tartılarak bir erlenmayer içerisine aktarılmıştır. Üzerine 1X konsantrasyona sahip TBE (Tris-Borate-EDTA) Buffer'dan eklenerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra erlenmayer mikro dalga fırında kaynar hale gelene kadar ısıtılmıştır.

Isıtma işleminden sonra erlenmayer içerisindeki jel oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Hafif ılık hale gelen jel üzerine 10 µl Ethidium Bromide (EtBr) eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda homojen olana kadar karıştırılmıştır. Hazır hale gelen jel elektroforez tankına dökülmüştür. Daha sonra tankın tarakları yerleştirilerek jel donmaya bırakılmıştır.

Donan jelin ilk ve son kuyularına Gene Ruler 1 kb DNA (Marker) Ladder (Thermo Scientific, Kat. no: SM0312)'dan 3 µl yüklenmiştir. Daha sonra genomik DNA'lar kuyulara sırasıyla 2 µl DNA, 2 µl 6X Loading Dye (Thermo Scientific) ve 6 µl TBE Buffer ile karıştırılarak yüklenmiştir. Yüklenen genomik DNA örnekleri elektroforezde koşturulmuştur.

Bu işlemden sonra jel, elektroforez tankından çıkarılarak DNR MiniBIS Pro jel görüntüleme cihazında UV ışık altında görüntülenmiştir. Bu sayede DNA'lar jelde görünür hale getirilmiş ve jel resimleri kaydedilmiştir.

2.5. Genomik DNA Örneklerinde PIK3CA Geninin Exon 9 ve Exon 20 Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle Çoğaltılması

Öncelikli olarak çoğaltma işlemi yapılacak gen bölgelerine ait primerler için uygun T_m (bağlanma) derecelerine bağlı olarak PCR’da programlar kurulmuştur. Bu programlar Çizelge 2.1. ve Çizelge 2.2.’de verilmiştir. Ayrıca PCR’da kullanıcak olan primerlerin sekansları da Çizelge 2.3.’de sırasıyla verilmiştir.

PCR’ da kalıp olarak kullanılacak genomik DNA’ların yapılan optimizasyon işlemlerine göre 20-60 ng/μl konsantrasyon aralığında olması gerekmektedir. Bunun için nanodrop ile ölçülen DNA konsantrasyonları göz önüne alındığında uygun dilüsyon işlemleri ile DNA konsantrasyonlarının 20-60 ng/μl aralığında olması sağlanmıştır. Bu sayede DNA’lar kalıp olarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. exon 20 bölgesinin baz dizisi uzun olduğundan dolayı sağlıklı bir çoğaltma işlemi için bu bölge exon 20_1 ve exon 20_2 şeklinde iki primer çifti kullanılarak çoğaltılmıştır.

Primer olarak üç farklı primer çifti kullanılmıştır. PCR ve sekanslama işleminde kullanıcak olan primer çiftleri PIK3CA geninin exon 9 ve exon 20 bölgelerini çoğaltacak şekilde seçilmiştir (Samuels vd., 2004). Bu primer çiftleri, Exon 9 bölgesi için exon 9F, exon 9R; exon 20_1 bölgesi için exon 20_1F, exon 20_1R ve exon 20_2 bölgesi için de exon 20_2F, exon 20_2R primerleridir.

Çoğaltma işlemi için 20-60 ng/μl kalıp DNA örneklerinden 2 μl, 4 μl 10X Taq buffer, 6 μl MgCl₂ (10 mM), 1 μl dNTP (10 mM), 1 μl reverse primeri (exon 9R, exon 20_1R, exon 20_2R) (10 pmol), 1 μl forward primeri (exon 9F, exon 20_1F, exon 20_2F) (10 pmol), 0,5 μl Taq DNA Polimeraz (Thermo Scientific, USA) karışımı oluşturulmuş ve reaksiyon hacmi 50 μl ye ddH₂O ile tamamlanmıştır.

Çoğaltma işlemi PCR tüplerinde, Sensoquest Labcycler (Germany) marka PCR (thermal cycler) cihazında gerçekleştirilmiştir. Böylece çalışmaya alınan olguların tamamında PIK3CA geninin exon 9 ve exon 20 gen bölgelerinin çoğaltılması sağlanmıştır.

Çizelge 2. 1. Exon 9 ve exon 20_1 bölgelerine ait PCR programı.

Aşama	Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
1	Ön denatürasyon	95°C	10 dakika	1
2	Denatürasyon	95°C	30 saniye	35
3	Bağlanma	66°C	1 dakika	35
4	Uzama	72°C	1 dakika	35
5	Son Uzama	72°C	7 dakika	1
6	İnkübasyon	4°C	∞	

Çizelge 2. 2. Exon 20_2 bölgesine ait PCR programı.

Aşama	Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
1	Ön denatürasyon	95°C	10 dakika	1
2	Denatürasyon	95°C	30 saniye	35
3	Bağlanma	55°C	1 dakika	35
4	Uzama	72°C	1 dakika	35
5	Son Uzama	72°C	7 dakika	1
6	İnkübasyon	4°C	∞	

Çizelge 2. 3. PCR’da kullanılan exon 9 ve exon 20 bölgelerine ait primerler ve sekansları.

Primer Adı	Primer Sekansı (5' - 3')
Exon 9F	GATTGGTTCTTTCCTGTCTCTG
Exon 9R	CCACAAATATCAATTTACAACCATG
Exon 20_1F	TGGGGTAAAGGGAATCAAAAG
Exon 20_1R	CCTATGCAATCGGTCTTTGC
Exon 20_2F	TTGCATACATTGCGAAAGACC
Exon 20_2R	GGGGATTTTTGTTTTGTTTTG

2.6. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

80 adet olguya ait genomik DNA'nın, PIK3CA geninin exon 9 ve exon 20 bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır. Bu PCR ürünlerini UV ışık altında görünür hale getirebilmek için agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. Bunun için öncelikle %2'lik bir agaroz jel hazırlanmıştır. 4 gr agaroz (Sigma) hassas terazide tartıldıktan sonra bir erlenmayer içerisine aktarılmıştır. Üzeri 200 ml'ye tamamlanacak şekilde TBE Buffer (1X) eklenmiş ve mikro dalga fırında kaynayana kadar ısıtılmıştır. Kaynar halde bulunan jel oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Jel hafif ılık hale geldiğinde üzerine 20 µl Ethidium Bromide (EtBr) eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda homojen olana kadar karıştırılmıştır. Hazır hale gelen jel, elektroforez tankına dökülmüştür. Daha sonra tankın tarafları yerleştirilerek jel donmaya bırakılmıştır.

Donan jelin ilk ve son kuyularına Gene Ruler 100 bp DNA (Marker) Ladder (Thermo Scientific, Kat. no: SM0241)'dan 3 µl yüklenmiştir. Daha sonra PCR ürünlerinden kuyulara sırasıyla, 8 µl PCR ürünü ve 2 µl 6X Loading Dye (Thermo Scientific) şeklinde yüklenmiştir. Jele yüklenen PCR ürünleri elektroforezde koşturulmuştur.

Bu işlemden sonra jel, elektroforez tankından çıkarılarak DNR MiniBIS Pro jel görüntüleme cihazında UV ışık altında görüntülenmiştir. Bu sayede PCR ürünleri jelde görünür hale getirilmiş ve jel resimleri kaydedilmiştir.

2.7. PCR Ürünlerinin ExoSAP Enzimi İle Purifikasyonu

Sekanslama aşamasına geçilmeden önce PCR ürünlerinin saf ve temiz olması gerekmektedir. Bu anlamda PCR işlemi sonucunda tüp içerisinde hala bağlanmamış dNTP'ler ve kalıp DNA'lar bulunmaktadır. Sekanslama işleminde bu dNTP ve kalıp DNA'lar kirlilik oluşturduğu için sağlıklı sonuçlar elde edilememektedir.

Ortamdaki bu kirlilikten kurtulmak için ExoSAP enzimi kullanılmıştır. Bu enzim, ekzonükleaz-I ve SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) aktivitesi göstermektedir.

Enzim ekzonükleaz-I aktivitesi ile ortamda bulunan tek zincirli kalıp DNA'ları ve bağlanmamış primerleri ortadan kaldırırken SAP aktivitesi ile de ortamda bulunan dNTP'lerin 5' fosfat (PO₄) uçlarını kesmektedir. Bu sayede PCR ürünleri saf ve temiz hale getirilmiştir.

PCR ile çoğaltılan exon 9 ve exon 20 gen bölgelerini purifiye etmek için örnek sayısı kadar PCR tüpü çıkarılıp ve etiketlenmiştir. Çoğaltılan PCR ürünlerinden 5 µl ve ExoSAP (GML, England) enziminden 2 µl alınarak PCR tüpü içerisine koyulmuştur. PCR tüpleri hafif vorteks, spin-down yapıldıktan sonra hava kabarcığı varsa giderilmiştir. Böylece hazırlanan tüpler PCR'a yerleştirilmiş ve ExoSAP PCR programında çalıştırılmıştır. ExoSAP PCR programı Çizelge 2.4.'de verilmiştir. PCR işlemi ile birlikte örnekler saf ve temiz hale getirilmiştir. PCR sonucu örnekler sekanslama için hazır haldedir.

Çizelge 2. 4. ExoSAP PCR programı.

Aşama	Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman
1	Enzim Aktivasyonu	37°C	30 dakika
2	Enzim İnaktivasyonu	80°C	15 dakika
3	İnkübasyon	4°C	∞

2.8. Sekans Reaksiyonlarının Hazırlanması

PCR ürünleri ExoSAP purifikasyonu ile birlikte sekanslamaya hazır hale getirilmiştir. Sekanslama işlemi için her örnek başına bir PCR reaksiyonu hazırlanır. Sekans PCR reaksiyonların normal PCR reaksiyonlarından farkı ise bu aşamada ddNTP (dideoksinükleotid trifosfat)'lerin kullanılmasıdır. Bunlar ddATP, ddGTP, ddCTP ve ddTTP'dir. ddNTP'lerin normal dNTP'lerden farkı ise 3' ucunda bir oksijen (O) atomunun eksik olmasıdır. Bu sayede PCR'da uzama aşamasında her ddNTP eklenmesinde reaksiyon durur ve sentezlenen iplik zincirden ayrılır. Böylece farklı uzunluklarda binlerce DNA fragmenti oluşturulmuş ve istenilen gen bölgelerinin DNA dizilimi çıkarılmış olur.

Bu aşamada sekans reaksiyonlarında üç adet gen bölgesine ait (exon 9, exon 20_1, exon 20_2) üç farklı sekans primeri kullanılmıştır. Bu primerler; exon 9 bölgesi için exon 9_Seq, exon 20_1 bölgesi için exon 20_1Seq ve exon 20_2 bölgesi için de exon 20_2Seq primerleridir. Bu primerlerin sekansları Çizelge 2.5.'de verilmiştir. Daha sonra her bir olgu için üç adet sekans reaksiyonu (exon 9, exon 20_1, exon 20_2) hazırlanmıştır. Yani toplamda 80 olgu için 240 sekans reaksiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan üç reaksiyonun içerikleri Çizelge 2.6., Çizelge 2.7. ve Çizelge 2.8.'de verilmiştir.

Sekans reaksiyonları için BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) kullanılmıştır. Bu kit içerisinde BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 Mix, BigDye Terminator 5X Sequencing Buffer reaktifleri bulunmaktadır.

Çizelge 2. 5. Sekanslamada kullanılan exon 9 ve exon 20 bölgelerine ait primerler ve sekansları.

Primer Adı	Primer Sekansı (5' - 3')
Exon 9_Seq	TTGCTTTTTCTGTAAATCATCTGTG
Exon 20_1Seq	TGACATTTGAGCAAAGACCTG
Exon 20_2Seq	TTTGTTTTGTTTTGTTTTTT

Çizelge 2. 6. Exon 9 bölgesi için hazırlanan sekans reaksiyon içeriği.

PCR Bileşeni	Miktar (µl)
BigDye Terminator RR-100 Mix	2 µl
BigDye Terminator 5x Sequencing Buffer	2 µl
ddH ₂ O	2 µl
Exon 9_ Seq Primeri	2 µl
PCR Ürünü	2 µl
Total	10 µl

Çizelge 2. 7. Exon 20_1 bölgesi için hazırlanan sekans reaksiyon içeriği.

PCR Bileşeni	Miktar (µl)
BigDye Terminator RR-100 Mix	2 µl
BigDye Terminator 5x Sequencing Buffer	2 µl
ddH ₂ O	2 µl
Exon 20_1Seq Primeri	2 µl
PCR Ürünü	2 µl
Total	10 µl

Çizelge 2. 8. Exon 20_2 bölgesi için hazırlanan sekans reaksiyon içeriği.

PCR Bileşeni	Miktar (µl)
BigDye Terminator RR-100 Mix	2 µl
BigDye Terminator 5x Sequencing Buffer	2 µl
ddH ₂ O	2 µl
Exon 20_2 Seq Primeri	2 µl
PCR Ürünü	2 µl
Total	10 µl

PCR tüpleri içerisinde hazırlanan reaksiyonlar hafif vorteks ve spin-down yapıldıktan sonra PCR cihazına yerleştirilmiş ve örnekler Sekans_PCR programında çalıştırılmıştır. Sekans_PCR programının içeriği Çizelge 2.9.'da verilmiştir. Bu sayede çalışmaya alınan olgulara ait DNA dizisi çıkarılması istenen PIK3CA geni üzerindeki exon 9 ve exon 20 bölgelerinin sekanslama işlemi, Sanger Dideoksi Zincir Sonlandırma Metodu ile yapılmıştır.

Çizelge 2. 9. Sekans_PCR programı.

Aşama	Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
1	Ön denatürasyon	96°C	1 dakika	1
2	Denatürasyon	96°C	10 saniye	25
3	Bağlanma	50°C	5 saniye	25
4	Uzama	60°C	4 dakika	25
5	İnkübasyon	4°C	∞	

2.9. Sekans PCR Ürünlerinin Sephadex İle Purifikasyonu

Sekanslama işlemi öncesindeki son basamak olan Sephadex purifikasyonu önemli bir aşamadır. Sekanslamada temel unsur sekanslanacak olan PCR ürünlerinin temiz olmasıdır. Sekans PCR'ı sonrasında PCR tüplerinin içerisinde bağlanmamış primerler, dNTP'ler ve ddNTP'ler bulunmaktadır. Örneklerin bu reaktiflerden arındırılması için Sephadex ile saflaştırma işlemi yapılmıştır.

Sephadex solüsyonu için, 1 gr Sephadex (Genomed, Kat. no:S6022) hassas terazide tartıldıktan sonra üzeri 15 ml'ye ddH₂O ile bir falcon tüp içerisinde tamamlanmıştır. Bu solüsyon, kapiller jel elektroforezinden 1-2 saat önce hazırlanarak +4°C'de bekletilmiştir. Daha sonra sekanslanacak örnek sayısı kadar spin column (Genomed) tüp çıkarılarak etiketlenmiştir. Sephadex solüsyonundan 700 µl mikropipet ile çekilerek spin column tüplerine aktarılmıştır. Tüpler 4600 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra altta kalan toplama tüpü atılmıştır. Spin column tüplerinin içerisinde bir sephadex bloğu oluşturulmuştur. Bu bloğun kırılmaması çok önemlidir. Bu yüzden dikkatli bir şekilde spin column tüplerinin üst kısmı yeni toplama tüplerine yerleştirilmiştir. Daha sonra sekans PCR'ından çıkan örneklerin tamamı (10 µl) mikropipet ile çekilerek spin column tüplerinin içerisindeki sephadex bloklarının üzerine dikkatli bir şekilde bırakılmıştır. Tüpler 4600 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonucunda alt kısımdaki, toplama tüpü içerisinde bulunan solüsyon sekanslama işlemi için hazır hale getirilmiştir. Tüpler, daha sonra Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazına yüklenmek üzere -20°C'ye kaldırılmıştır.

2.10. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer Cihazı

Sekanslama işlemi, Sanger Dideoksi Zincir Sonlandırma Metodu tekniği ile bu metodu otomatize hale getirmiş Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazında yapılmıştır. Sekans PCR ürünlerini cihaza yüklemekten önce cihaz bakımı ve temizliği sekansların sağlıklı bir şekilde oluşturulması için çok önemlidir.

Bu anlamda çalışmaya başlamadan önce cihaz temizliği ve cihaz solüsyonlarının hazırlanması sağlanmıştır. Ayrıca cihazda sekans dosyalarının arşivlenebilmesi ve ileriki aşamalarda mutasyon analizi yapılabilmesi için gerekli programlar cihaza tanımlanmıştır. Bu sayede cihaz sekanslama için kullanıma hazır hale getirilmiştir. PCR ve sekans PCR aşamaları sonucunda elde ettiğimiz 80 olguya ait toplam 240 sekans ürünü Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazına yüklenerek run edilmiş ve sekans sonuçları alınmıştır.

2.10.1. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazında yıkama işlemi ve cihaz solüsyonlarının hazırlanması

Öncelikle Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Japan) cihazı açılır. Daha sonra cihaza ait 'Foundation Data Collection v3.0' Software'i açılır. Software açıldığında bilgisayar ekranında bir 'service console' oluşur. Bu konsol cihaz servislerini aktif hale getirir. Konsol içerisinde 'messaging, data, instrument ve viewer' servisleri bulunmaktadır. Aktivasyon işlemi için kırmızı renkte olan bu servislerin tamamının yeşil hale gelmesi beklenir. Bu sayede cihaz servisleri aktif hale getirilmiştir. Daha sonra aşağıdaki aşamalar uygulanmıştır.

Aktivasyon işleminden sonra cihazın kapakları açılır. Cihaz içerisinde bulunan polimer şişesi çıkarılarak içerisinde ddH₂O bulunan yıkama şişesi bu alana yerleştirilir. Daha sonra anod rezervuarı olan 'Buffer Jar' yerinden çıkarılır ve bu bölgenin altına steril kurutma kağıdı yerleştirilir. 'Foundation Data Collection v3.0' Software'i içerisinde bulunan cihaza ait seri numarası üzerine mouse ile tıklanır. Bu sayede software üzerinde yer alan 'Wizards' sekmesi aktif hale getirilir.

'Wizards' sekmesi içerisinde 'Water Wash Wizard' basamağı seçilir ve cihazın kapakları kapatılır. Daha sonra 'Water Wash Wizard' sekmesinde 'next' basamağı seçilerek cihazın ddH₂O ile iyice temizlenmesi sağlanır. Bu işlem sonrasında vakum pompası, buffer bağlantı borusu, polimer bağlantı borusu ve piston içerisinde hava kabarcığı (bubble) olmamasına dikkat edilir. Eğer bubble varsa yıkama işlemi bubble giderilene kadar devam ettirilir.

'Water Wash Wizard' aşamasının 3. basamağında cihaz, polimer şişesinin yerine takılmasını ister. ddH₂O ile yıkama sonrasında cihazın kapakları açılır ve yıkama şişesi yerinden çıkarılarak yerine içerisinde POP7 polimeri (Applied Biosystems, Kat. no: 4332241, USA) bulunan polimer şişesi takılır. 3. basamakta kullanılacak olan polimerin Lot Numarası daha önce kullanılan polimer ile aynı ise 'Same Lot' , farklı ise 'Different Lot' sekmesi seçilerek next tuşuna basılır. 'Different Lot' sekmesi seçildiğinde ekranda yeni bir konsol oluşur. Bu konsolda polimer tipi, lot numarası ve son kullanma tarihleri ilgili yerlere yazılarak next tuşuna basılır.

Bu aşamadan sonra cihaz solüsyonlarının hazırlanması gerekir. Öncelikle cihaz içerisinde bulunan 3 adet su rezervuarı, katot ve anod rezervuarları ddH₂O ile iyice yıkandıktan sonra steril kurutma kağıdı üzerinde kurumaları sağlanır. Daha sonra su rezervuarları ddH₂O ile seviye çizgisine kadar doldurulur ve üzerleri septa ile kapatılır. Anod ve katot rezervuarları için 1X konsantrasyona sahip buffer hazırlanır. Bunun için bir falcon tüp içerisine Buffer (10X) with EDTA (Applied Biosystems, USA)'dan 5 ml koyularak üzeri 50 ml'ye ddH₂O ile tamamlanır. Hazırlanan buffer anod ve katot rezervuarları içerisine seviye çizgisine kadar eklenir. Cihaz solüsyonları hazırlandıktan sonra cihaz içerisindeki bölmelerine takılır.

Solüsyonlar ve POP7 polimer cihaza yerleştirildikten sonra 'Water Wash Wizard' sekmesinin 4. basamağına geçilir. Bu basamakta 'Flush with Fresh Polymer' sekmesi seçilerek kapillerlere polimer basılır. Bu işlem sonrasında vakum pompası veya vakum borularının içerisinde bubble olmamasına dikkat edilir. Eğer bubble varsa 'Flush Array Port' sekmesi seçilerek bubble giderilmesi sağlanır. Hava kabarcıkları tamamıyla giderildikten sonra 'Finish' sekmesi seçilerek cihazın yıkama işlemi sonlandırılmış olur ve cihaz artık örnek yüklemesi için hazır haldedir.

2.10.2. Foundation Data Collection v.3 Software’inde çalışma ile ilgili sonuç grubunun oluşturulması

Sekanslanacak olan örneklerin bilgisayar ortamında kaydedilip daha sonra analiz kısmında software tarafından tanınabilmesi için öncelikle bu çalışma ile ilgili Foundation Data Collection v.3 Software’inde bir sonuç grubu (results group) oluşturulmuştur.

Bu sonuç grubunun oluşturulması için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır. ‘Foundation Data Collection v3.0’ Software’ inde ‘results group’ sekmesi açılır. Daha son yeni bir results group için ‘new’ basamağı seçilir. Açılan pencerede ‘general’ sekmesinde ‘results group name’ kısmına çalıştığımız gen ismi olan PIK3CA yazılır. ‘Analysis’ sekmesinde, ‘analysis type’ kısmında sekanslama analizi yapacağımız için ‘sequencing analysis’ butonu seçilir. ‘Destination’ sekmesinde ‘use custom location’ aktif edildikten sonra ‘root destination’ kısmına sonuçların kaydedileceği yer seçilir. Son olarak ‘Naming’ sekmesinde ‘sample file name format’ kısmı ‘sample name, capillary number, well position, none’ şeklinde doldurulur. ‘Run folder name format’ kısmı ise ‘plate name, run name, run sequence number, none’ şeklinde doldurulur. Bu işlem ile birlikte artık cihazda sekans dosyalarının kaydedileceği bir results group oluşturulmuş olur.

2.10.3. Foundation Data Collection v.3 Software’inde çalışma ile ilgili run modülünün oluşturulması

Sekanslama işleminin yapılabilmesi için cihaz içerisinde sekanslanacak örneklerin yürütme koşullarını içeren bir ‘run modülü’ nün oluşturulması gerekmektedir. Bu run modülü, örneklerin yürütülmesi sırasında cihaza ait ortam koşullarını içeren değerlerden oluşmaktadır. Bu anlamda çalışılacak olan PIK3CA geni için cihazda yeni bir run modülü oluşturulmuştur. Run modülünün oluşturulması için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır.

‘Foundation Data Collection v3.0’ Software’inde ‘module manager’ sekmesi açılır. Açılan pencerede yeni bir modül oluşturabilmek için ‘new’ sekmesi seçilir ve bununla birlikte ‘run module editor’ penceresi açılmış olur.

Bu kısımda yeni modül için 'name' kısmına bir isim yazılır. 'Type' menüsünden 'regular' çalışma tipi seçilir. 'Template' menüsünden daha önce cihaza tanımlanmış olan bir template seçilir. Açılan template'e Çizelge 2.10.'daki değerler girilerek kaydedilir. Bu işlem ile birlikte çalışma için, cihazda yeni bir run modülü oluşturulmuştur.

Çizelge 2. 10. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazında sekanslama işlemi için oluşturulan run modülü değerleri.

İsim	Değer	Aralık
Oven_Temperature	60	18-65 Deg. C
Poly_Fill_Vol	6500	6500-38000 steps
Current_Stability	5.0	0-2000 uAmps
PreRun_Voltage	15.0	0-15 kVolts
PreRun_Time	180	1-1000 sec.
Injection_Voltage	1.2	1-15 kVolts
Injection_Time	18	1-600 sec.
Voltage_Number_Of_Steps	30	1-100 nk
Voltage_Step_Interval	15	1-60 sec
Data_Delay_Time	120	1-3600 sec
Run_Voltage	8.5	0-15 kVolts
Run_Time	2780	300-14000 sec.

2.10.4. Seq Scape v.2.6 Software'inde çalışma ile ilgili projenin oluşturulması

Sekans sonuçları alındıktan sonra mutasyon analiz işleminin yapılabilmesi için Seq Scape v.2.6 Software'inde yeni bir projenin oluşturulması gerekmektedir. Bu anlamda çalışmanın yapıldığı PIK3CA geni için Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazının Seq Scape v.2.6 Software'inde yeni bir proje oluşturulmuştur. Proje oluşturma aşamasında aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır.

Öncelikle çalışmaya alınan 80 olguda PIK3CA geni üzerindeki exon 9 ve exon 20 bölgelerinin mutasyon analizlerinin yapılabilmesi için bir referans PIK3CA gen dizisi gerekmektedir.

NM_006218 gen bank numarasına sahip bu referans gen dizisi NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanından fasta formatında indirilmiştir. Daha sonra aşağıdaki adımlar izlenmiştir.

Seq Scape v.2.6 Software'i açılır. 'Tools' sekmesinde 'Seq Scape Manager' penceresi seçildikten sonra 'Project Templates' basamağı seçilir ve burada yeni bir proje için 'New' adımı seçilir.

Açılan pencerede 'Project Template Name' ve 'Referans Data Group' sekmesi seçildikten sonra 'Referance Data Group Name' kısmına PIK3CA yazılır. Daha sonra üst kısımda yer alan 'ROI' sekmesi açılır ve 'Add Referance Segment' kısmında, daha önceden NCBI veri tabanından indirmiş olduğumuz PIK3CA referans gen dizisi seçilir. Diğer sekmeler cihaz tarafından otomatik olarak tanımlandığı için bu sekmelerde herhangi bir değişim yapılmaz. Daha sonra 'Ok' kısmından oluşturulan proje kaydedilir ve Seq Scape software ana ekranına geri dönülür. Burada 'File' kısmından 'New Project' sekmesi açılır. Açılan pencerede oluşturduğumuz PIK3CA projesi seçilip kaydedilir. Bu işlem ile birlikte PIK3CA gen dizisi, mutasyon analizi için hazır hale getirilmiştir.

2.11. Kapiller Jel Elektroforezi

Kapiller jel elektroforezi, elektroforetik hareket kabiliyeti, faz ayırımı ve moleküler boyuttaki farklılıklara ya da bunların bir kaçına bağlı olarak elektrokinetik ayırım yapan bir tekniktir. Bu elektrokinetik ayırım iki ucu açık, dış yüzeyi silika ile kaplı, yaklaşık 25-75 µm iç çaplı ve 15-100 cm uzunluğunda, silindirik kapillerlerde yapılır. Kapiller, elektrotları ve tamponu içeren iki cam hazne arasına yerleştirilmiş olup, kapillerler jel ile dolduktan sonra çok az miktardaki örnek, kapillerin bir ucuna elektrokinetik ve hidrodinamik teknikle yüklenir. Ayırım yüksek voltaj(yaklaşık 5-30 kV, 1-150 µA) uygulayarak yaklaşık 200-500 V/cm doğru akım altında sağlanır.

Bu çalışmada örneklerin kapiller jel elektroforezi için Applied Biosystem 3130xl Genetic Analyzer cihazında 16 adet 36 cm'lik kapillerler kullanılmıştır.

Deneysel aşamalar sonucunda 80 olguya ait 240 adet sekans PCR ürünü sekanslama işlemi için hazır halde -20°C’de bekletilmiştir. Bu örnekler 96’lık well plate’lere yüklenerek Applied Biosystem 3130xl Genetic Analyzer cihazında kapiller jel elektroforezine tabi tutulmuş ve sonuç olarak 240 adet sekans datası elde edilmiştir. Bu işlemler için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır.

Sekans PCR sonrası sephadex bloklarından geçirilen örnekler saf hale getirildikten sonra cihaza yüklemek üzere hazır hale getirilmiş ve -20°C’ye kaldırılmıştır. Yükleme işlemi için 96’lık well plate’ler kullanıldığından bir defada 96 adet örnek cihazda run edilmiştir. Run işlemi için 96 adet örnek -20°C’den çıkarılarak çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen örneklerin tamamı (10 µl) 96’lık well plate’e (Kat no: N8010560, Applied Biosystems, USA) sırası dikkate alınarak mikropipet ile yüklenmiştir. Yükleme işleminden sonra well plate’in üzeri plate septa (Kat. no: 4315933, Applied Biosystems, USA) kapatılmış ve plate santrifüjde kısa süreli santrifüj edilmiştir. Tüm bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan plate, plate holder’a yerleştirildikten sonra kapağı kapatılmıştır. Sekanslama için hazır hale getirilen plate Applied Biosystem 3130xl Genetic Analyzer cihazında plate haznesine yerleştirilmiştir.

Cihaza ait Foundation Data Collection Software’i açılmış ve ‘plate manager’ sekmesinde yeni bir plate oluşturulmuştur. well plate’e yüklenen örnekler ‘sample sheet’ kısmında sırası ile yazıldıktan sonra kaydedilmiştir. ‘Run scheduler’ sekmesinde oluşturulan plate seçilmiş ve plate haznesi ‘link’ edilmiştir. Daha sonra ‘start’ tuşuna basılarak örnekler run edilmiştir. Diğer örneklerde de aynı işlemler uygulanmıştır. Run işlemleri sonrası 80 olguya ait 240 adet PIK3CA (exon 9, exon 20) gen sekansı elde edilmiştir. Sekanslama işlemi sonrasında sekansların kalitesi ve güvenilirliği, Sequencing Analysis 5.3.1 Software’inde ‘electroferogram’ ve ‘raw data’ kısmından gözlemlenmiştir.

2.12. Sekanslanan Örneklerde Exon 9 ve Exon 20 Bölgelerinin Mutasyon Analizi

Exon 9 ve exon 20 bölgeleri sekanslanan 80 olguya ait toplam 240 adet sekans dosyasının, Seq Scape Software’inde referans PIK3CA gen dizisi ile karşılaştırılarak mutasyon analizleri yapılmıştır. Mutasyon analizi için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır.

Seq Scape Software’ında ‘file’ sekmesinden ‘open project’ basamağı seçilir. Açılan pencerede daha önceden mutasyon analizi için oluşturmuş olduğumuz PIK3CA projesi açılır. Açılan pencerede PIK3CA referans gen dizisi mevcuttur. Daha sonra ‘file’ sekmesinden ‘add samples’ basamağı seçilir ve sekanslanan örnekler bu referans dizinin altına eklenir ve ‘analysis’ tuşuna basılarak örnekler analiz ettirilir. Analiz işlemi sonrasında cihaz, referans dizi ile sekanslanan dizileri hizalar ve ortamda nükleotid değişimleri (mutasyon) var ise ‘mutation report’ kısmında liste şeklinde verir. ‘Mutation report’ kısmında belirtilen mutasyonlar teker teker incelenerek kaydedilmiştir.

2.13. Biyoinformatik Analiz

Çalışmalar sonucunda 80 olguya ait PIK3CA geni üzerindeki exon 9 ve exon 20 bölgelerinde belirlenen mutasyonlarda nükleotid değişimi, amino asit değişimi ve fenotipe olan etki Ensembl, NCBI, OMIM, Uniprot gibi veri tabanlarında araştırılmış ve sonuçlar kaydedilmiştir.

3. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, kolorektal kanser gelişiminde etkisi olduğu düşünülen PIK3CA geninin, exon 9 ve exon 20 bölgeleri üzerindeki mutasyonları belirlemek amacıyla, Muğla bölgesi örnekleminde hastaneye gelerek kolorektal kanser tanısı almış hastalar ile çeşitli nedenlerden dolayı ameliyatla kolonu çıkarılmış hastaların kolon dokuları kullanılmıştır. Tümör, tümör kontrol ve normal kontrol grubuna ait kolon dokularının hematoxilen eozin ile boyanmış prepatları mikroskop altında incelenmiştir. Bu incelemeler ile birlikte patoloji raporları da göz önünde bulundurulduğunda, kolorektal kanser hasta grubunun tamamının adenokarsinom tipte olduğu, diğer tümör kontrol ve normal kontrol gruplarının ise sağlıklı dokulara sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma grupları; tümör (T), tümör kontrol (TC) ve kontrol (C) şeklinde üç ayrı grupta sıralanmıştır. Çalışma kapsamında, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi gelen kolorektal kanser tanısı almış 30 adet olgu KKK hasta grubu, bu hastalara ait 20 adet olgu tümör kontrol grubu ve hastaneye gelerek çeşitli sebeplerden dolayı kolon rezeksiyon materyali çıkarılan sağlık kolon dokularına sahip 30 adet olgu da kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Çalışma için gerekli olan Etik Kurul Raporu Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

Kolorektal kanser, kalın bağırsak kanseri olarak da adlandırılmakla birlikte kalın bağırsak ve rektumda görülen malign yani kötü huylu tümörlerin oluşumu ile karakterize bir hastalıktır. Kolorektal kanser, görülme sıklığı bakımından tüm kanserler arasında meme, prostat ve akciğer kanserlerinden sonra 4. sırada yer almakta ve erkek ve kadınlarda görülen kanserlerin yaklaşık %10-15'ini oluşturmaktadır. PIK3CA geni, hücre proliferasyonu, hayatta kalması, metabolizması ve motilitesi dahil olmak üzere çeşitli hücresel fonksiyonların düzenlemesinde görevli bir gendir. Bu gen üzerinde meydana gelen mutasyonlar birçok çalışmada kanser gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Literatürde PIK3CA'nın baş ve boyun, prostat, üreter sistem, serviks, meme ve endometrium kanser tiplerinde %30 oranında mutasyona uğradığı bildirilmiştir.

Ayrıca literatürdeki birçok çalışma sonucunda, bu gen üzerinde en fazla mutasyona uğrayan bölgelerin exon 9 ve exon 20 bölgeleri olduğu bildirilmiştir. Bu açıdan incelendiğinde, bu tez çalışmasında kolorektal kanserli olgularda PIK3CA geni üzerinde bulunan exon 9 ve exon 20 bölgelerindeki mutasyonlar incelenmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında izlenilen deney akışı şu şekilde özetlenebilir: Çalışılacak olan üç farklı hasta grubuna ait parafine gömülü kolon doku bloklarından mikrotom ile 3-5 µm çapında kesitler alınarak steril endorf tüplerine alınmıştır. Daha sonra bu kesitlerden genomik DNA izolasyon işlemi, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Kat No: 56404, Qiagen, Germany) ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen genomik DNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri nanodrop (Maestrogen, Taiwan) ile ölçülmüş ve sonuçlar kaydedilmiştir. Bu işlemden sonra 80 adet genomik DNA örneğinde PIK3CA geninin exon 9 ve exon 20 bölgeleri, uygun primerler ile PCR'da çoğaltılmıştır. PCR sonuçları, %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir. PCR ürünlerinin saf ve temiz olabilmesi için ExoSAP enzimi ile purifikasyon işlemi yapılmıştır. Daha sonra her bir örnek için sekans reaksiyonu hazırlanmış ve örnekler sekans PCR işleminden geçirilmiştir. Bu işlem için BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) kullanılmıştır. Sekanslama için örneklerin temiz ve saf olması gerektiğinden, sekans PCR ürünlerine Sephadex (Genomed, Kat. no:S6022) ile purifikasyon işlemi yapılmış ve örnekler sekanslama için hazır hale getirilmiştir. Sekanslama işleminin yapılabilmesi için öncelikle Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazında çalışma için gerekli programlar kurulmuştur. Daha sonra örnekler sekanslama işlemi için 96'lık well plate'lere yüklendikten sonra Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazına yerleştirilerek run edilmiştir. Run işleminden sonra her bir örnek için ilgili gen bölgesinin nükleotid dizilimi çıkarılmış ve data lar Sequencing Analysis v5.3.1 Software'inde incelenmiştir. 80 adet olguya ait toplam 240 adet sekans sonucunun Seq Scape v2.6 Software'inde mutasyon analizleri yapılmış ve her bir gen bölgesi için tespit edilen mutasyonlar kaydedilmiştir. Elde edilen mutasyonlar daha sonra NCBI, Ensembl, Uniprot, OMIM gibi çeşitli veri tabanlarında araştırılarak biyoinformatik analizleri yapılmıştır. Tüm bu deneylerin sonucunda elde edilen bulgular detaylı olarak, başlıklar halinde, aşağıda anlatılmaktadır.

3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışma kapsamında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı'nın doku arşivi ve verileri kullanılarak 2012 ve 2016 yılları arasında hastaneye gelerek kolorektal kanser tanısı almış hastalara ait kolon doku blokları seçilmiştir. Olguların kolon dokularına ait hematoksil-eoza ile boyanmış preparatları (Şekil 3.1.) incelenerek histolojik tip, grade, patolojik evre, lokasyon ve lenf nodu metastazı gibi klinikopatolojik veriler elde edilmiştir. Çalışma grubu olarak; 30 adet kolorektal kanserli tümör grubu ve bu gruba ait 20 adet tümör kontrol grubu (Çizelge 3.1.), 30 adet de normal kontrol grubu (Çizelge 3.2.) olmak üzere toplamda 80 adet hastaya ait doku örneği kullanılmıştır. Tümör grubunda yer alan hastaların 20 tanesine ait sağlıklı kolon dokusu tümör kontrol (TC) grubu adı altında kullanılmıştır. Bu grupta yer alan kolon doku örneklerinde herhangi bir kanserleşme olmadığından dolayı hasta kontrolü olarak kullanılmıştır. Normal kontrol grubu ise hastaneye gelerek çeşitli sebeplerden dolayı ameliyatla kolon rezeksiyon materyali çıkarılan hastaların doku bloklarından seçilmiştir.

Çizelge 3. 1. Tümör grubuna ait olguların demografik ve klinikopatolojik özellikleri.

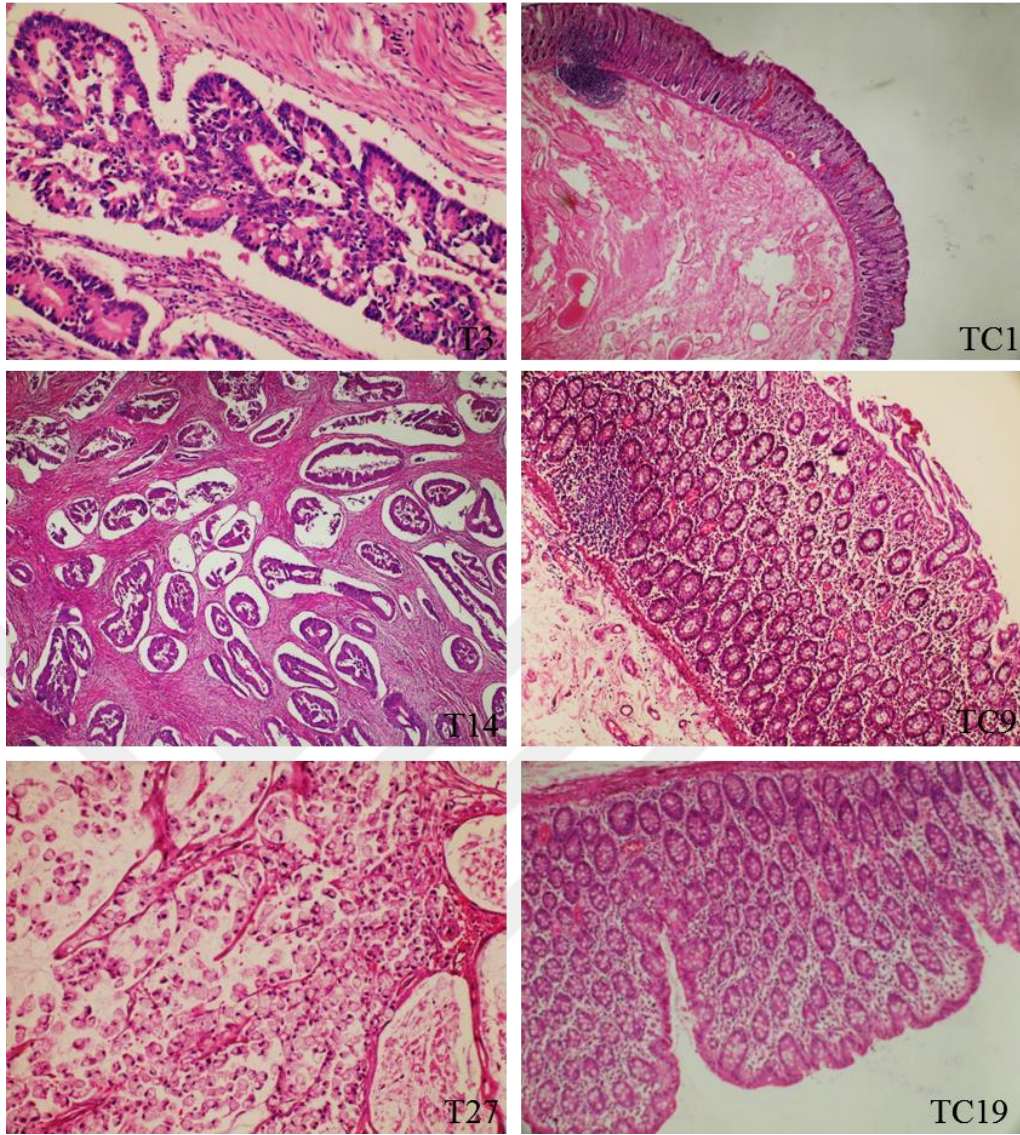
Örnek Kodu	Cinsiyet (♂/♀)	Yaş	Histolojik Tip	Grade	Patolojik Evre	Lokasyon	Lenf Nodu Metastazı	Tümör Kont. Blok
T1	♂	73	Adenokarsinom	Orta	T3	Rektum	Var	-
T2	♂	44	Adenokarsinom	Orta	T3	Rektum	Yok	-
T3	♂	75	Adenokarsinom	Orta	T3	Çekum	Yok	TC1
T4	♂	72	Adenokarsinom	Orta	T4	Sigmoid Kolon	Var	-
T5	♀	66	Adenokarsinom	Orta	T2	Rektum	Yok	-
T6	♀	77	Adenokarsinom	Orta	T3	Rektum	Var	-
T7	♀	60	Adenokarsinom	Orta	T3	Rektum	Yok	TC3
T8	♀	78	Adenokarsinom	Orta	T4	İnen Kolon	Var	TC4
T9	♂	62	Adenokarsinom	Orta	T4	Rektum	Var	TC5
T10	♂	58	Adenokarsinom	Orta	T3	Rektum	Yok	TC2

Çizelge 3.1. (devam)

T11	♀	71	Adenokarsinom	Orta	T3	Rektum	Var	TC6
T12	♀	47	Adenokarsinom	Orta	T3	Rektum	Yok	TC7
T13	♀	76	Adenokarsinom	Orta	T3	Rektum	Yok	-
T14	♀	83	Adenokarsinom	Orta	T4	Çıkan Kolon	Var	TC9
T15	♀	75	Adenokarsinom	Orta	T3	İnen Kolon	Yok	TC10
T16	♂	74	Adenokarsinom	Orta	T4	Çıkan Kolon	Var	TC8
T17	♂	78	Adenokarsinom	İyi	T3	Rektum	Yok	TC11
T18	♂	80	Adenokarsinom	Orta	T3	Çekum	Var	TC12
T19	♂	43	Müsinöz Adenokarsinom	Az	T3	Çıkan Kolon	Yok	-
T20	♀	74	Adenokarsinom	Az	T3	Rektum	Var	TC13
T21	♂	72	Adenokarsinom	Orta	T3	Rektum	Var	TC14
T22	♀	75	Adenokarsinom	Orta	T2	Transvers Kolon	Yok	TC15
T23	♀	67	Adenokarsinom	Az	T3	Çıkan Kolon	Var	TC16
T24	♂	82	Adenokarsinom	Orta	T1	Rektum	Yok	TC17
T25	♂	61	Adenokarsinom	Orta	T3	Rektum	Var	TC18
T26	♀	61	Adenokarsinom	Orta	T3	Rektum		-
T27	♀	63	Müsinöz Adenokarsinom	Orta	T3	Çıkan Kolon	Yok	TC19
T28	♀	54	Adenokarsinom	Orta	T1	Rektum	Var	-
T29	♀	64	Adenokarsinom	Orta	T3	Çıkan Kolon	Yok	TC20
T30	♀	61	Adenokarsinom	Orta	T2	Rektum	Yok	-

Çizelge 3. 2. Kontrol grubuna ait örneklerin demografik özellikleri.

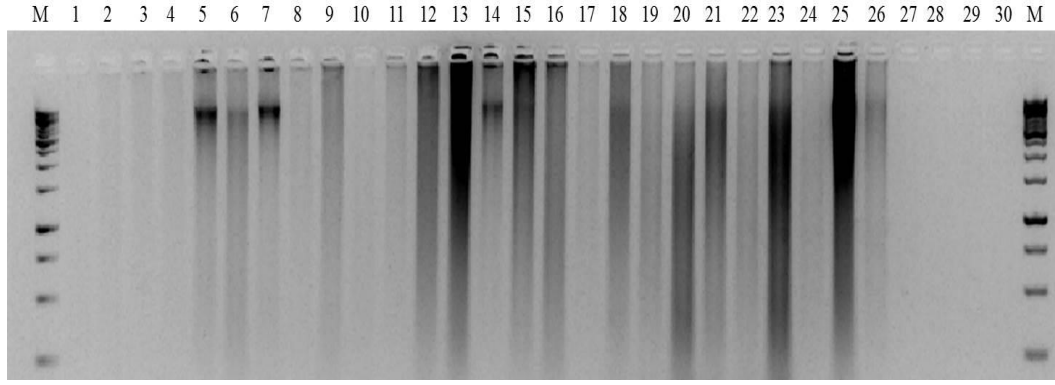
Örnek Kodu	Cinsiyet (♂/♀)	Yaş
C1	♀	58
C2	♂	79
C3	♀	60
C4	♂	34
C5	♂	41
C6	♀	74
C7	♂	51
C8	♀	19
C9	♂	71
C10	♂	32
C11	♀	83
C12	♀	18
C13	♀	33
C14	♂	80
C15	♀	72
C16	♀	79
C17	♀	62
C18	♀	72
C19	♂	31
C20	♀	37
C21	♂	42
C22	♀	46
C23	♂	32
C24	♂	59
C25	♀	47
C26	♂	75
C27	♀	78
C28	♀	65
C29	♂	53
C30	♀	81



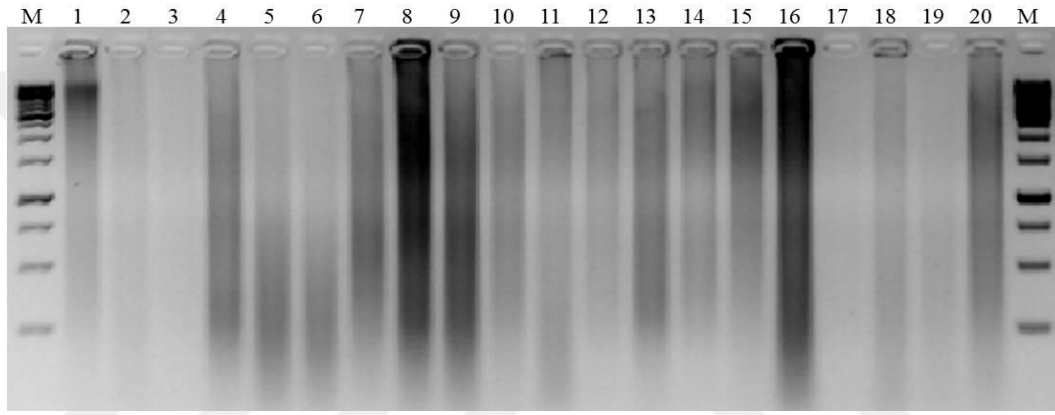
Şekil 3. 1. Bazı olgulara ait hematoksilin eozin ile boyanmış kolon doku örneklerinin mikroskopik görüntüsü (T: Tümör, TC: Tümör kontrol).

3.2. Parafine Gömülü (FFPE) Doku Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

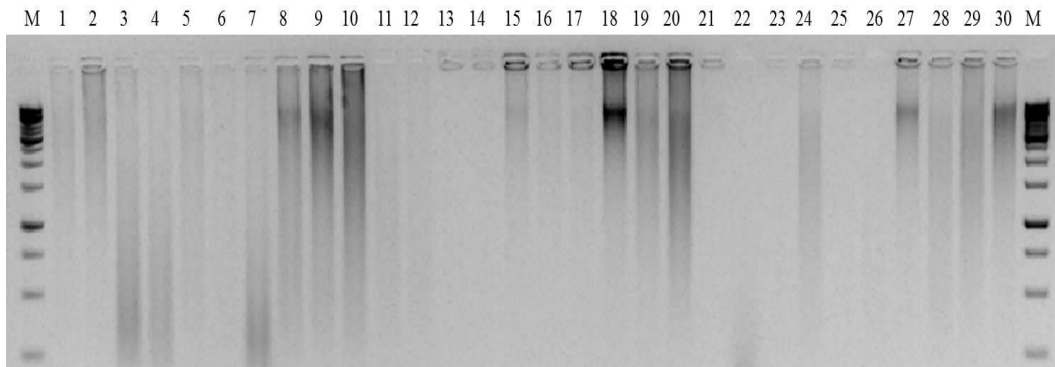
DNA izolasyonu, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Kat No: 56404, Qiagen, Germany) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA örneklerinden 3 µl yüklenerek agaroz jel elektroforez analizi sonrası, UV görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir (Şekil 3.2., Şekil 3.3., Şekil 3.4.).



Şekil 3. 2. Tümör grubuna ait örneklerin genomik DNA izolasyon sonucunun %0,8'lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü (M: 1kb'lik DNA Marker).



Şekil 3. 3. Tümör kontrol grubuna ait örneklerin genomik DNA izolasyon sonucunun %0,8 lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü (M: 1kb'lik DNA Marker).



Şekil 3. 4. Kontrol grubuna ait örneklerin genomik DNA izolasyon sonucunun %0,8'lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü (M: 1kb'lik DNA Marker).

3.3. İzole Edilen Genomik DNA'ların Nanodrop ile Konsantrasyon ve Saflık Derecelerinin Ölçülmesi

İzole edilen genomik DNA'ların konsantrasyon ve saflık dereceleri nanodrop (Maestrogen, Taiwan) cihazı (Şekil 3.5.) ile A230, A260 ve A280 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Elde edilen değerler Çizelge 3.3., Çizelge 3.4. ve Çizelge 3.5.' de verilmiştir.



Şekil 3. 5. Nanodrop cihazı (Maestrogen, Taiwan).

Çizelge 3. 3. Tümör grubuna ait örneklerin DNA konsantrasyon ve saflık değerleri.

Örnek	Konsantrasyon (ng/μl)	A260/280	A260/230
T1	23,51	2,375	2,558
T2	24,22	2,398	1,842
T3	35,75	2,232	2,326
T4	24,08	2,523	2,949
T5	171,43	2,207	2,144
T6	157,04	2,162	2,166
T7	177,53	2,333	2,058
T8	36,42	2,095	2,545
T9	138,25	1,914	2,048
T10	24,65	2,279	2,048
T11	39,49	2,333	2,667

Çizelge 3.3. (devam)

T12	225,55	2,024	2,11
T13	144,78	1,785	1,88
T14	693,29	2,025	2,16
T15	276,25	2,103	2,184
T16	209,05	2,121	2,076
T17	40,17	2,159	2,395
T18	718,21	2,00	2,046
T19	23,33	2,399	2,084
T20	734,22	2,171	2,036
T21	576,93	2,173	2,071
T22	50,88	1,963	2,032
T23	1202,18	2,187	2,033
T24	88,99	2,098	2,106
T25	1283,53	2,101	2,073
T26	20,07	2,101	2,529
T27	64,31	1,679	1,916
T28	47,2	2,173	2,319
T29	20,37	2,247	2,525
T30	19,87	2,465	2,422

Çizelge 3. 4. Tümör kontrol grubuna ait örneklerin DNA konsantrasyon ve saflık değerleri.

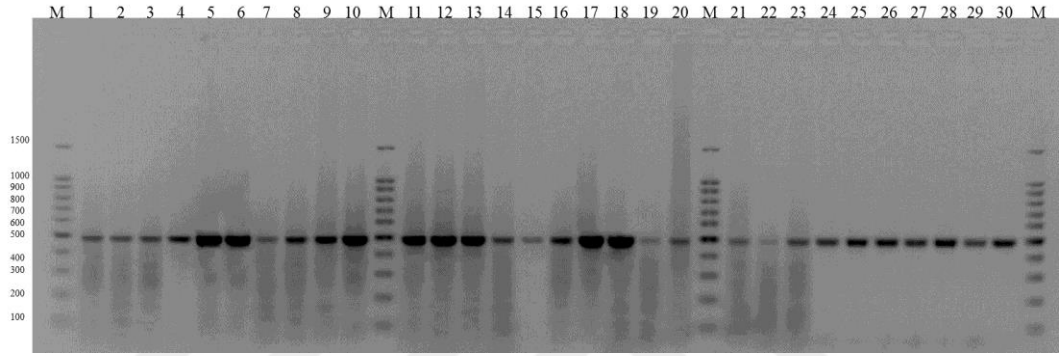
Örnek	Konsantrasyon (ng/μl)	A260/280	A260/230
TC1	125,3	1,893	2,013
TC2	24,73	2,554	2,193
TC3	23,33	2,399	2,084
TC4	141,36	2,086	1,623
TC5	322,69	2,24	2,241
TC6	34,83	2,875	2,575
TC7	191,71	2,213	1,912
TC8	763,18	2,159	2,019
TC9	444,18	2,16	2,03
TC10	102,7	2,093	1,951
TC11	202,18	1,621	1,679
TC12	180,69	2,176	1,881
TC13	246,54	2,144	1,745
TC14	203,82	2,26	2,021
TC15	540,65	2,161	2,073
TC16	737,01	2,121	2,036
TC17	30,56	2,27	0,89
TC18	33,97	1,992	1,95
TC19	19,87	2,465	2,422
TC20	318,52	2,164	1,995

Çizelge 3. 5. Kontrol grubuna ait örneklerin DNA konsantrasyon ve saflık değerleri.

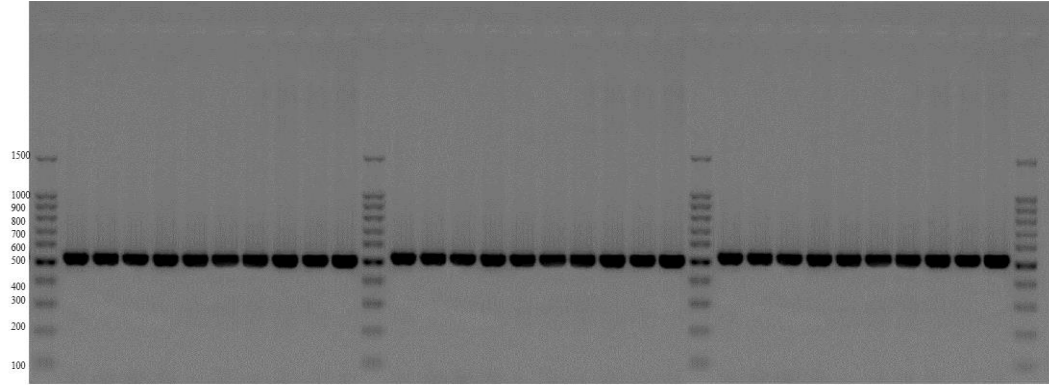
Örnek	Konsantrasyon (ng/µl)	A260/280	A260/230
C1	16,26	2,103	2,495
C2	53,62	2,342	2,028
C3	46,62	2,422	2,065
C4	163,8	2,146	1,731
C5	179,83	2,283	2,08
C6	59,58	2,335	2,09
C7	73,52	2,201	1,796
C8	214,49	2,25	2,088
C9	270,01	2,229	2,058
C10	275,58	2,215	2,162
C11	12,72	2,19	1,688
C12	25,67	2,184	2,221
C13	7,49	1,587	2,099
C14	9,91	2,149	1,072
C15	39,14	2,428	2,389
C16	35,28	2,339	1,973
C17	49,68	2,284	2,14
C18	220,48	2,167	2,061
C19	174,52	1,963	1,891
C20	184,43	2,222	2,1
C21	16,26	2,103	2,495
C22	8,05	1,468	1,07
C23	3,15	1,447	0,844
C24	53,62	2,342	2,028
C25	11,43	1,546	1,446
C26	14,18	1,46	1,757
C27	139,39	1,814	1,728
C28	31,13	1,98	1,744
C29	88,71	2,01	1,496
C30	216,73	2,218	1,658

3.4. Genomik DNA Örneklerinde PIK3CA Geninin Exon 9 ve Exon 20 Bölgelerinin PCR İle Çoğaltılması

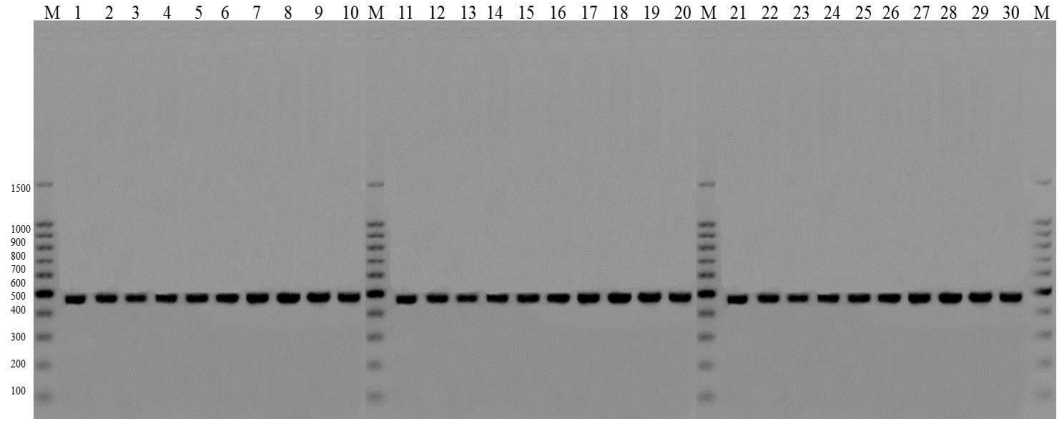
Genomik DNA izolasyonu sonucunda, her olgu için PIK3CA geninin exon 9 ve exon 20 bölgeleri exon 9F – exon 9R, exon 20_1F – exon 20_1R ve exon 20_2F - exon 20_2R primerleri ile PCR’da çoğaltılmıştır. PCR ürünleri, 8 µl örnek ve 2 µl 6x Loading Dye şeklinde %2’lik agaroz jele yüklenmiş ve jel elektroforezi sonucunda görüntüleme cihazında UV ışık altında gözlemlenmiştir. PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri Şekil 3.6. - Şekil 3.14.’de verilmiştir.



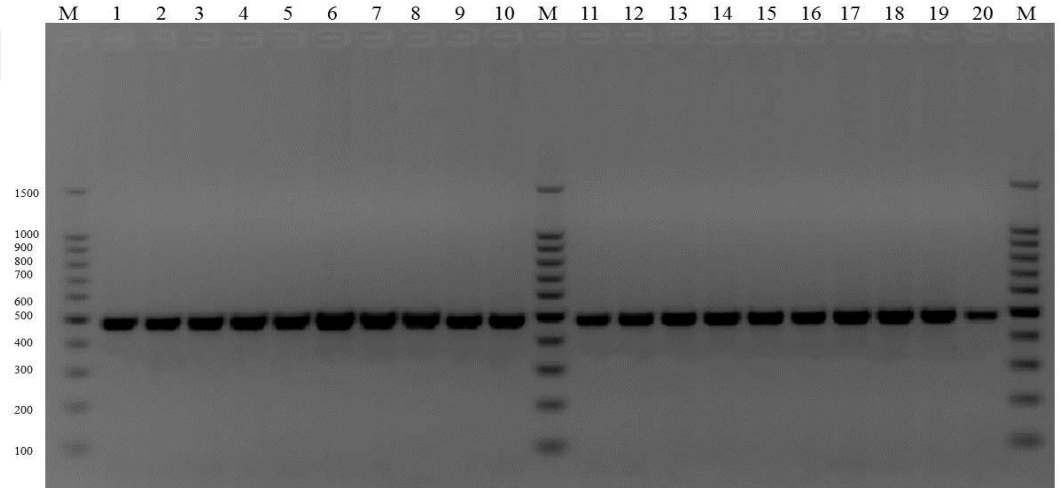
Şekil 3. 6. Tümör grubuna ait örneklerin PCR’da çoğaltılan exon 9 bölgelerinin %2’lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü (M: 100bp’lik DNA Marker, Exon 9: 486 bp).



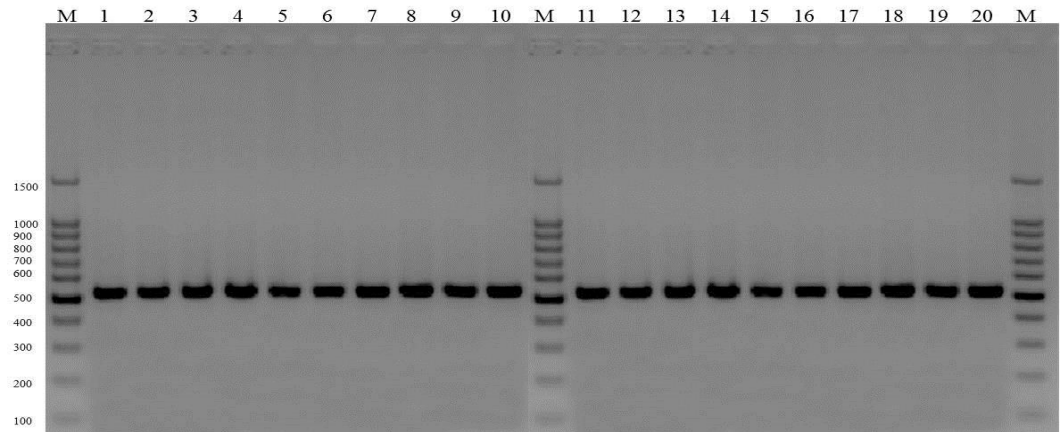
Şekil 3. 7. Tümör grubuna ait örneklerin PCR’da çoğaltılan exon 20_1 bölgelerinin %2’lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü (M: Marker, Exon 20_1: 524 bp).



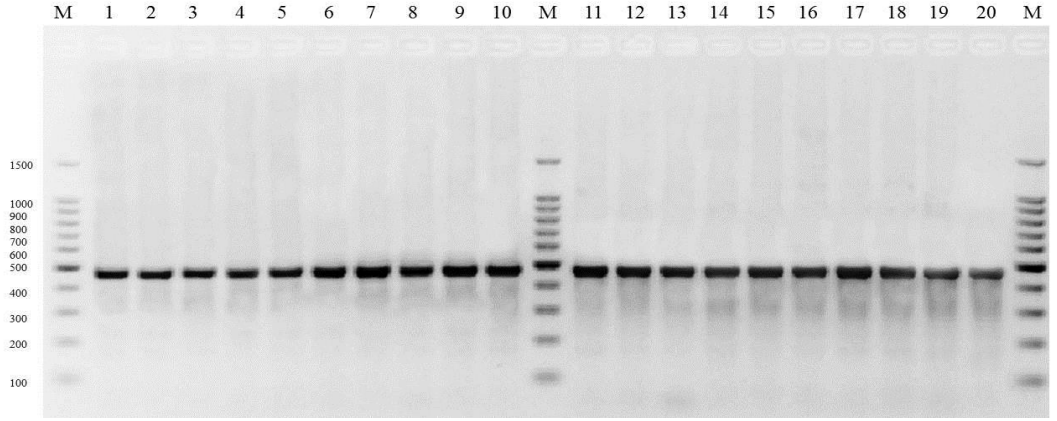
Şekil 3. 8. Tümör grubuna ait örneklerin PCR’da çoğaltılan exon 20_2 bölgelerinin %2’lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü (M:, Exon 20_2: 468 bp).



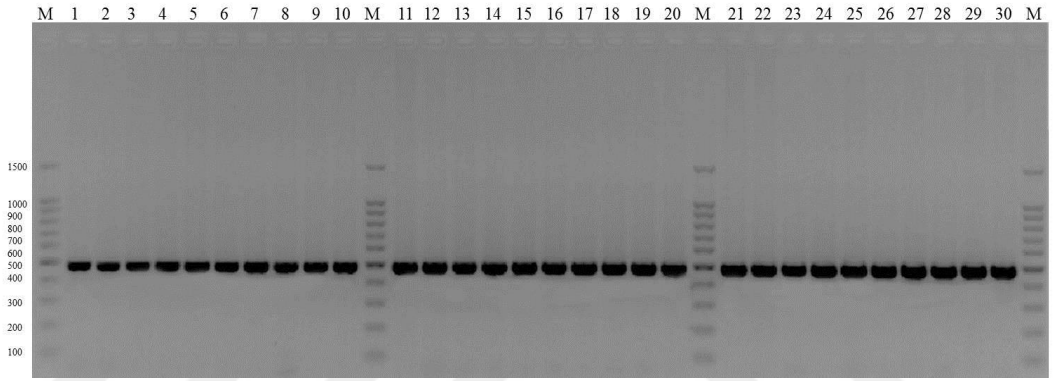
Şekil 3. 9. Tümör kontrol grubuna ait örneklerin PCR’da çoğaltılan exon 9 bölgelerinin %2’lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü (M: Marker, Exon 9: 486 bp).



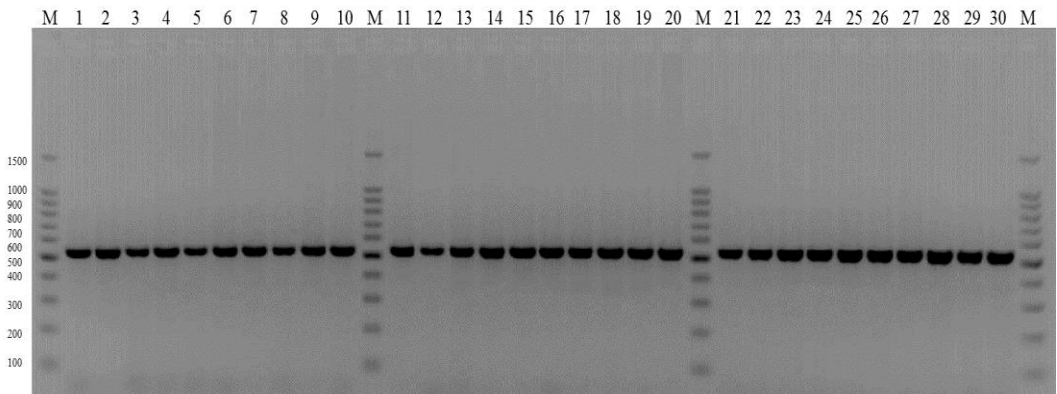
Şekil 3. 10. Tümör kontrol grubuna ait örneklerin PCR’da çoğaltılan exon 20_1 bölgelerinin %2’lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü (M: Marker, Exon 20_1: 524 bp).



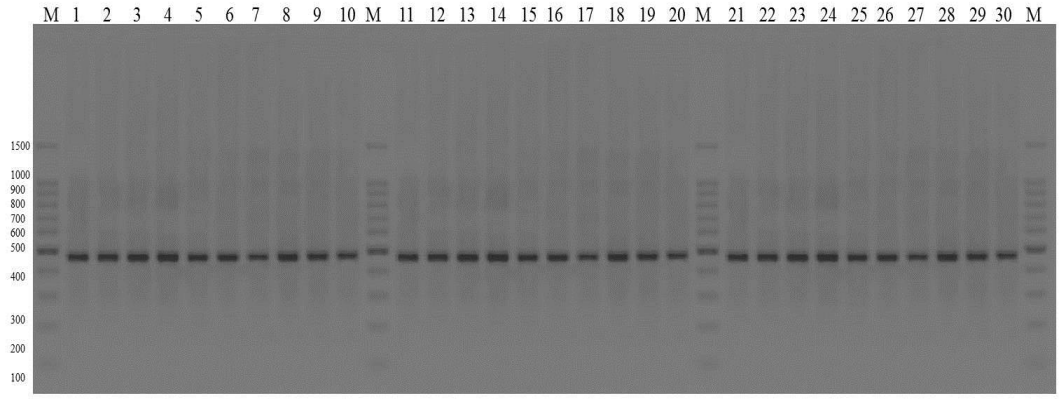
Şekil 3. 11. Tümör kontrol grubuna ait örneklerin PCR’ da çoğaltılan exon 20_2 bölgelerinin %2’ lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü (M: Marker, Exon 20_2: 468 bp).



Şekil 3. 12. Kontrol grubuna ait örneklerin PCR’da çoğaltılan exon 9 bölgelerinin %2’lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü (M: Marker, Exon 9: 486 bp).



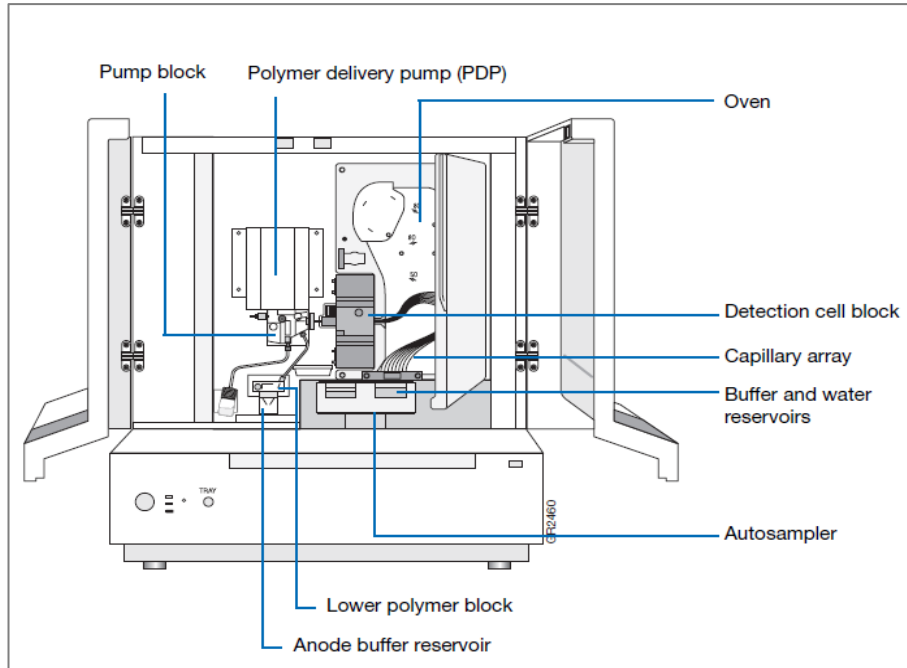
Şekil 3. 13. Kontrol grubuna ait örneklerin PCR’da çoğaltılan exon 20_1 bölgelerinin %2’lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü (M: Marker, Exon 20_1: 524 bp).



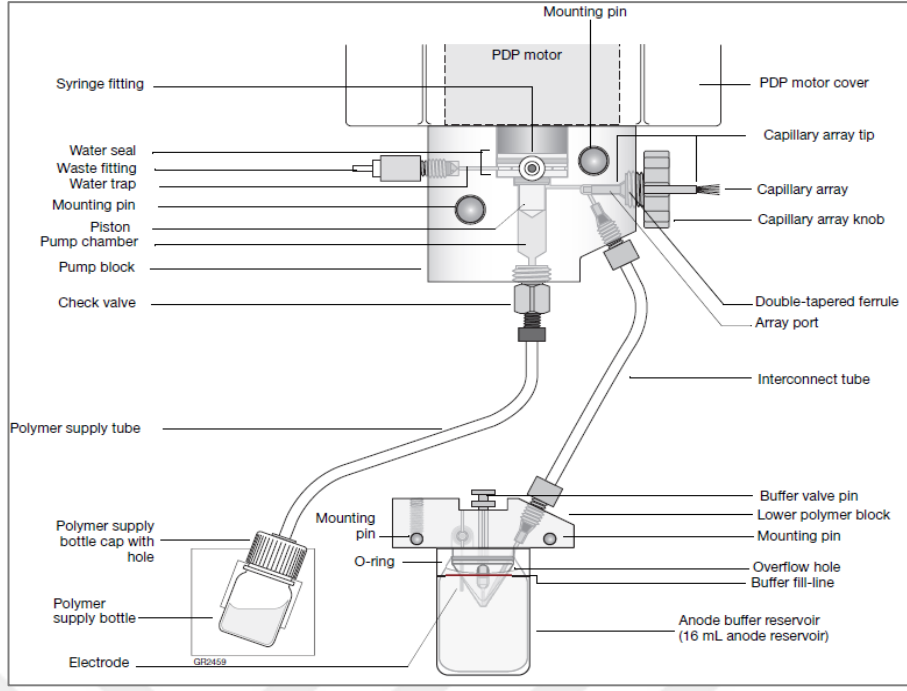
Şekil 3. 14. Kontrol grubuna ait örneklerin PCR’ da çoğaltılan exon 20_2 bölgelerinin %2’ lik agaroz jel elektroforezinin negatif görüntüsü (M: Marker, Exon 20_2: 468 bp).

3.5. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer Cihazı

Sekans PCR’ı yapılan örnekler, daha sonra sephadex purifikasyonuna tabi tutulmuş ve bu sayede örnekler saf ve temiz hale getirilmiştir. Bu aşamadan sonra örnekler 96’lık well plate’lere yüklenerek Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazında Sanger sekanslama teknolojisi ile sekanslanmıştır. Cihazın iç haznesi ve polimer pompa sistemi Şekil 3.15. ve Şekil 3.16.’da gösterilmiştir.



Şekil 3. 15. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazı ve iç haznesi.

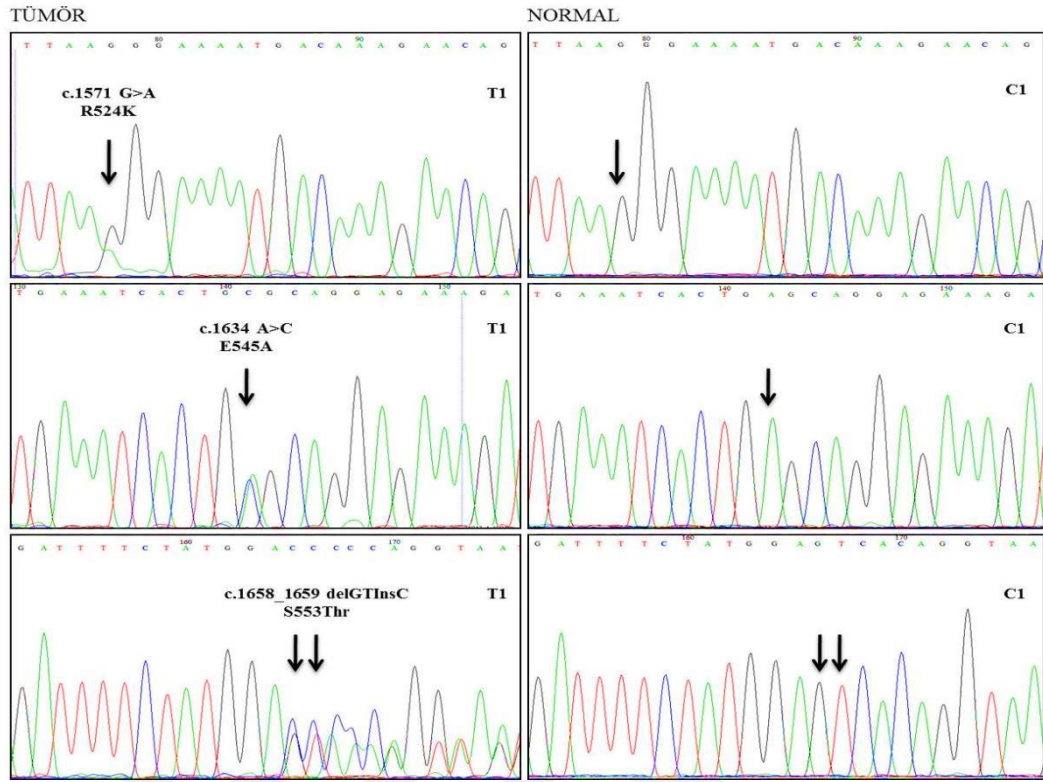


Şekil 3. 16. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazında polimer aktarma pompasının şematik görünümü.

3.6. Sekanslanan Örneklerde Exon 9 ve Exon 20 Bölgelerinin Mutasyon Analizi

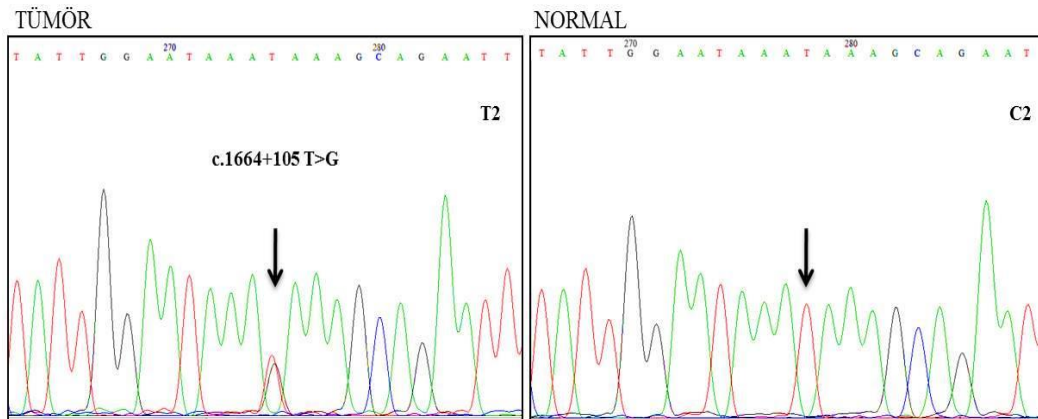
Çalışma kapsamında toplamda 80 adet olgunun PIK3CA genine ait exon 9, exon 20_1 ve exon 20_2 bölgeleri Sanger sekanslama teknolojisi kullanılarak sekanslanmıştır. Çalışma sonucunda toplam 80 olguya ait 240 adet sekans örneği elde edilmiştir. Sekanslama sonrasında kolorektal kanser vakalarında ve bunlara ait kontrol gruplarında mutasyon taramaları ve analizleri Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazına ait Sequencing Analysis v5.3.1 ve SeqScape v2.6 Software'lerinde yapılmıştır. Saptanan mutasyonlar, Ensembl, NCBI, Uniprot ve OMIM gibi çeşitli veri tabanlarında araştırılarak tanımlanmıştır.

SeqScape Software'inde T1 kodlu tümör olgusunun analizi sonucunda exon 9 bölgesinde c.1571 G>A (R524K), c.1634 A>C (E545A) ve c.1658_1659delGTİnsC (S553Thr) mutasyonları tespit edilmiştir. T1 kodlu tümör olgusunda tespit edilen mutasyonlar C1 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılarak Şekil 3.17.'de gösterilmiştir.



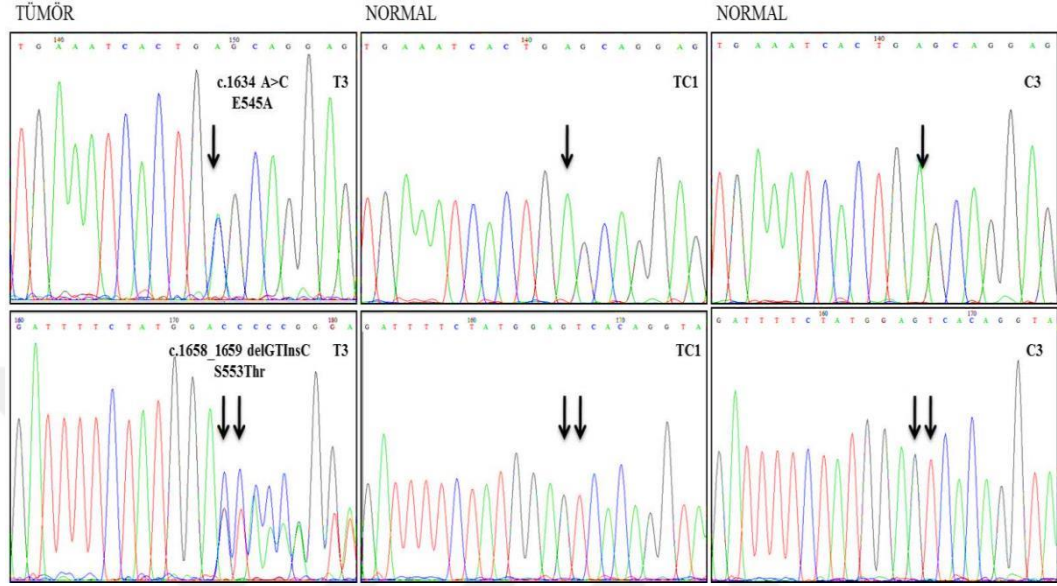
Şekil 3. 17. T1 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların C1 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.

SeqScape Software’inde T2 kodlu tümör olgusunun analizi sonrasında İntron 9 bölgesinde c.1664+105 T>G mutasyonu tespit edilmiştir. T2 kodlu tümör olgusunda tespit edilen bu mutasyon C2 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılarak Şekil 3.18.’de gösterilmiştir.



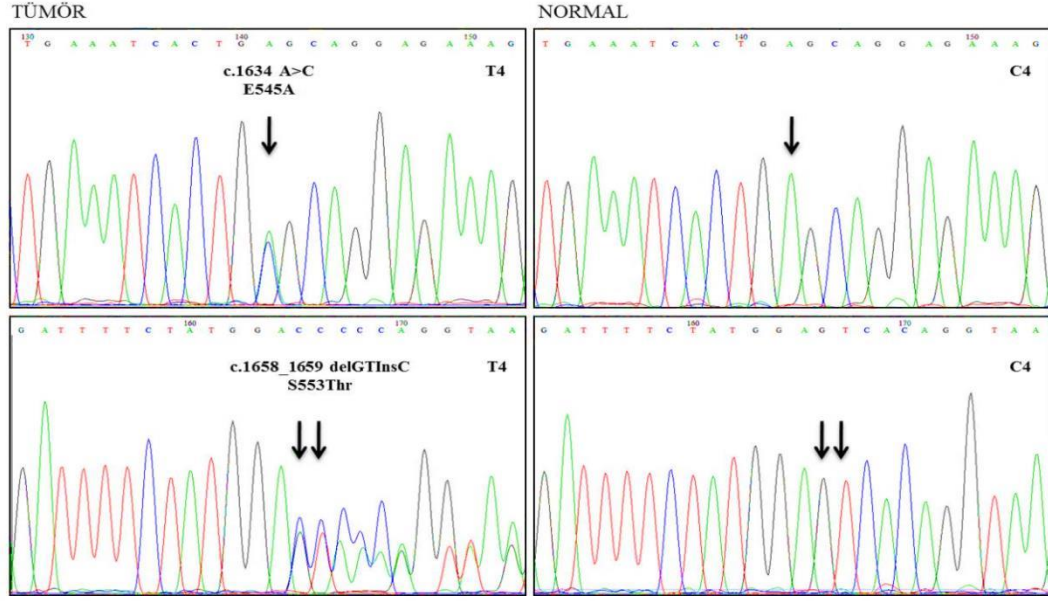
Şekil 3. 18. T2 kodlu tümör olgusunun intron 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonun C2 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.

SeqScape Software’inde T3 kodlu tümör olgusunun analizi sonrasında exon 9 bölgesinde c.1634 A>C (E545A) ve c.1658_1659delGTİnsC (S553Thr) mutasyonları tespit edilmiştir. Tespit edilen mutasyonlar TC3 numaralı tümör kontrol ve C3 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılarak Şekil 3.19.’da gösterilmiştir.



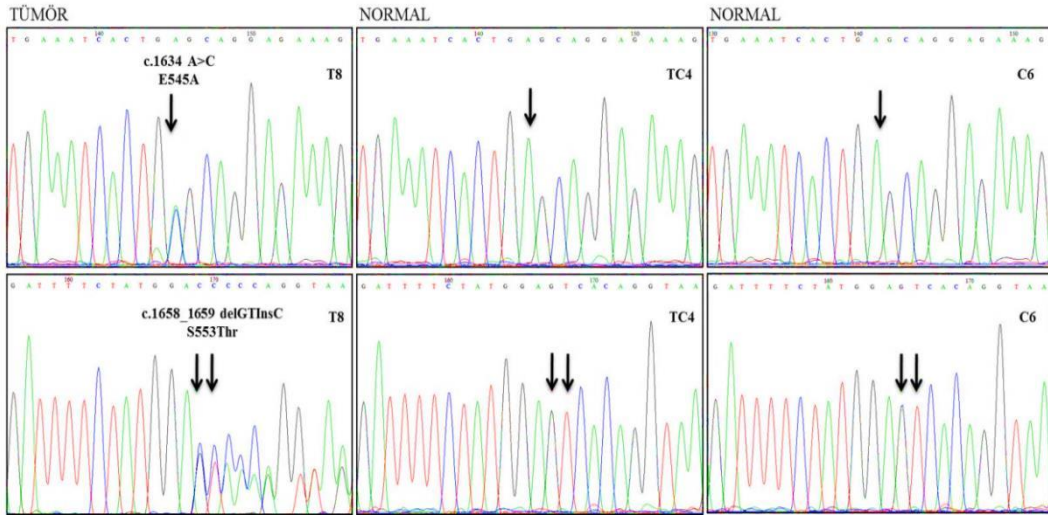
Şekil 3. 19. T3 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların TC1 kodlu tümör kontrol ve C3 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.

SeqScape Software’inde T4 kodlu tümör olgusunun analizi sonrasında exon 9 bölgesinde c.1634 A>C (E545A) ve c.1658_1659delGTİnsC (S553Thr) mutasyonları tespit edilmiştir. Tespit edilen mutasyonlar, C4 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılarak Şekil 3.20.’de gösterilmiştir.



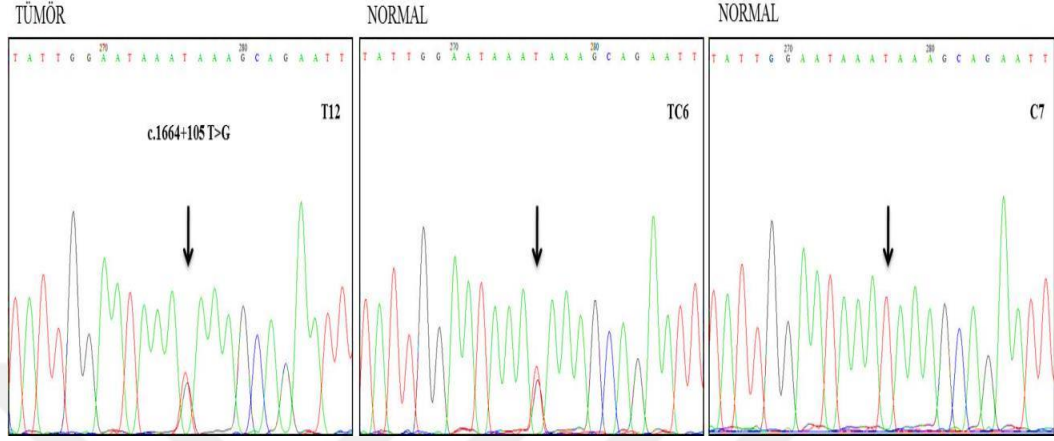
Şekil 3. 20. T4 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların C4 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.

SeqScape Software’inde T8 kodlu tümör olgusunun analizi sonrasında exon 9 bölgesinde c.1634 A>C (E545A) ve c.1658_1659delGTİnsC (S553Thr) mutasyonları tespit edilmiştir. Tespit edilen mutasyonlar, TC4 kodlu tümör kontrol ve C6 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılarak Şekil 3.21.’de gösterilmiştir.



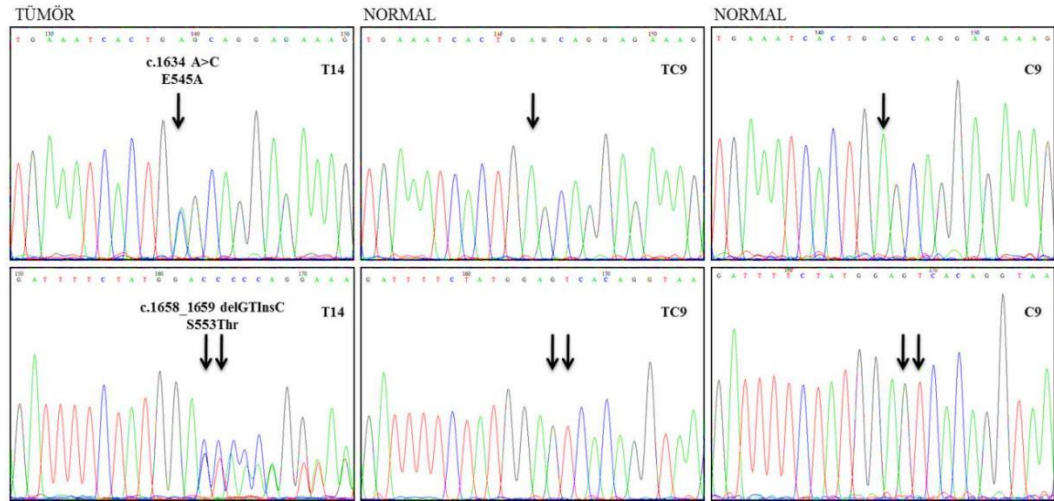
Şekil 3. 21. T8 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların TC4 kodlu tümör kontrol ve C6 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.

SeqScape Software’inde T12 kodlu tümör olgusunun analizi sonrasında İntron 9 bölgesinde c.1664+105 T>G mutasyonu tespit edilmiştir. Tespit edilen bu mutasyon TC6 kodlu tümör kontrol ve C7 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılarak Şekil 3.22.’de gösterilmiştir.



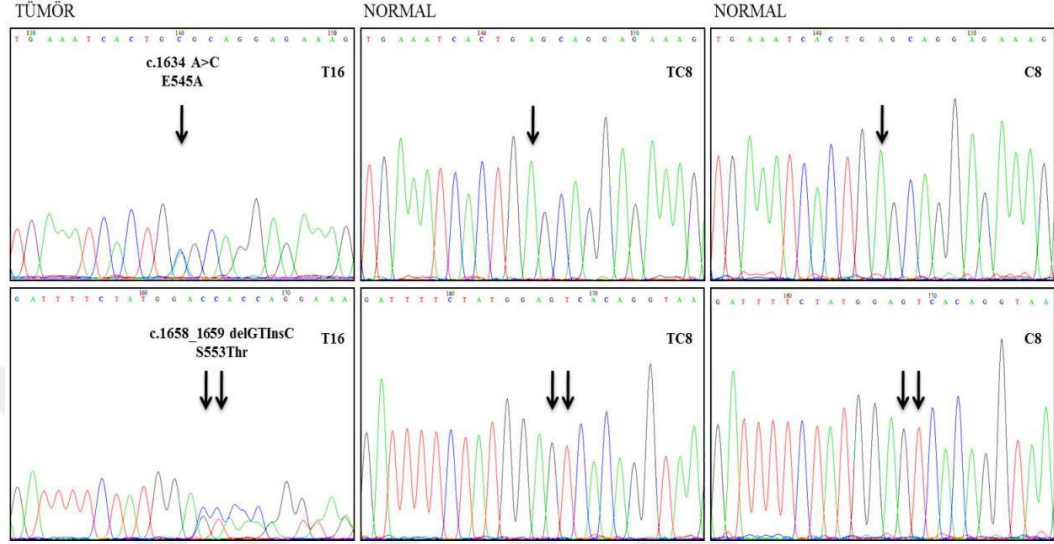
Şekil 3. 22. T12 kodlu tümör olgusunun intron 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonun TC6 kodlu tümör kontrol ve C7 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.

SeqScape Software’inde T14 kodlu tümör olgusunun analizi sonrasında exon 9 bölgesinde c.1634 A>C (E545A) ve c.1658_1659delGTİnsC (S553Thr) mutasyonları tespit edilmiştir. Tespit edilen mutasyonlar, TC9 kodlu tümör kontrol ve C9 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılarak Şekil 3.23.’de gösterilmiştir.



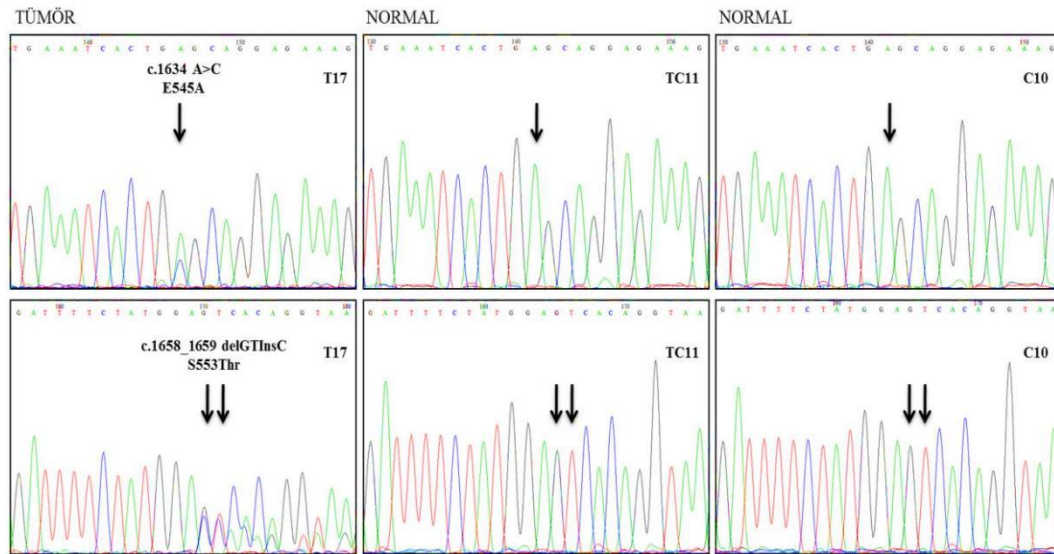
Şekil 3. 23. T14 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların TC9 kodlu tümör kontrol ve C9 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.

SeqScape Software’inde T16 kodlu tümör olgusunun analizi sonrasında exon 9 bölgesinde c.1634 A>C (E545A) ve c.1658_1659delGTİnsC (S553Thr) mutasyonları tespit edilmiştir. Tespit edilen mutasyonlar, TC8 kodlu tümör kontrol ve C8 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılarak Şekil 3.24.’de gösterilmiştir.



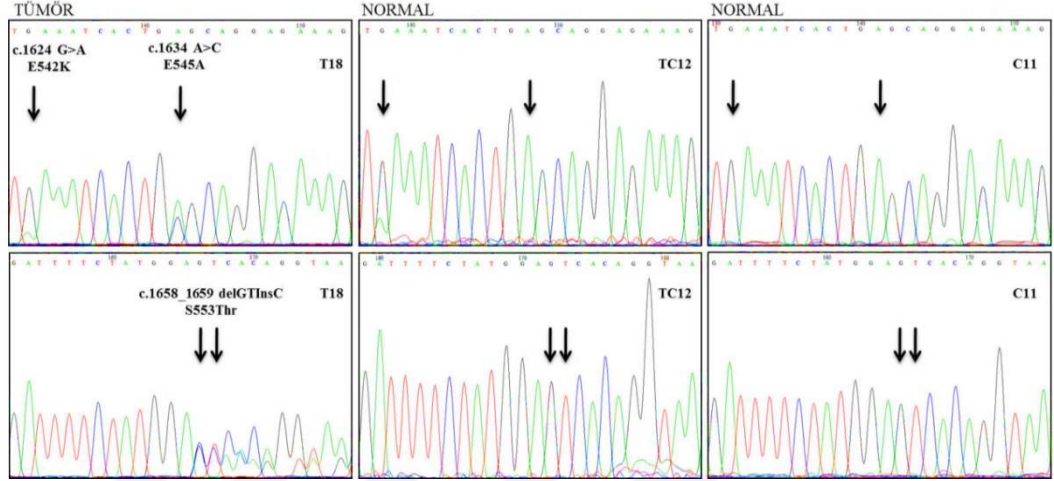
Şekil 3. 24. T16 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların TC8 kodlu tümör kontrol ve C8 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.

SeqScape Software’inde T17 kodlu tümör olgusunun analizi sonrasında exon 9 bölgesinde c.1634 A>C (E545A) ve c.1658_1659delGTİnsC (S553Thr) mutasyonları tespit edilmiştir. Tespit edilen mutasyonlar, TC11 kodlu tümör kontrol ve C10 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılarak Şekil 3.25.’de gösterilmiştir.



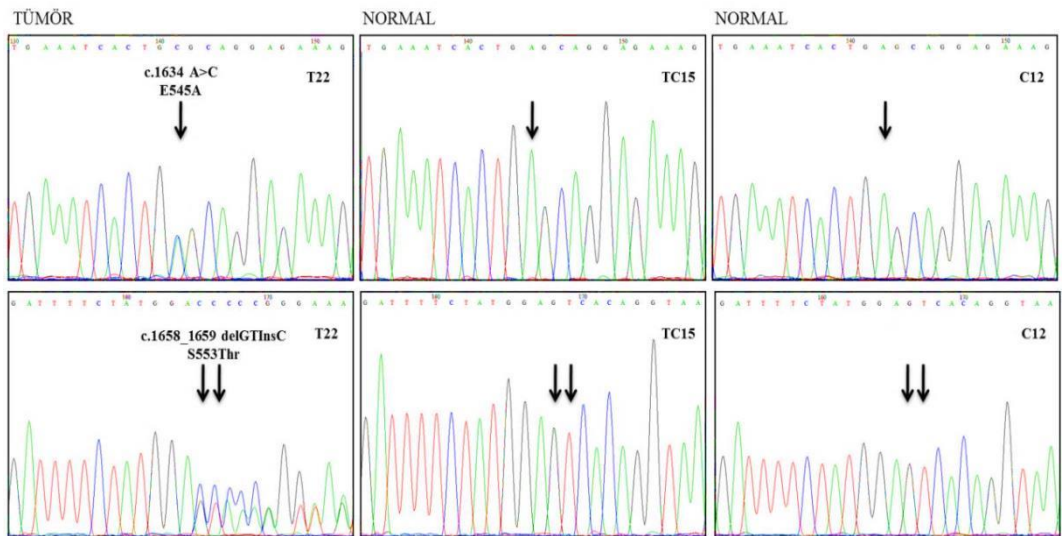
Şekil 3. 25. . T17 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların TC11 kodlu tümör kontrol ve C10 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.

SeqScape Software’inde T18 kodlu tümör olgusunun analizi sonrasında exon 9 bölgesinde c.1624 G>A (E542K), c.1634 A>C (E545A) ve c.1658_1659delGTİnsC (S553Thr) mutasyonları tespit edilmiştir. Tespit edilen mutasyonlar, TC12 kodlu tümör kontrol ve C11 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılarak Şekil 3.26.’da gösterilmiştir.



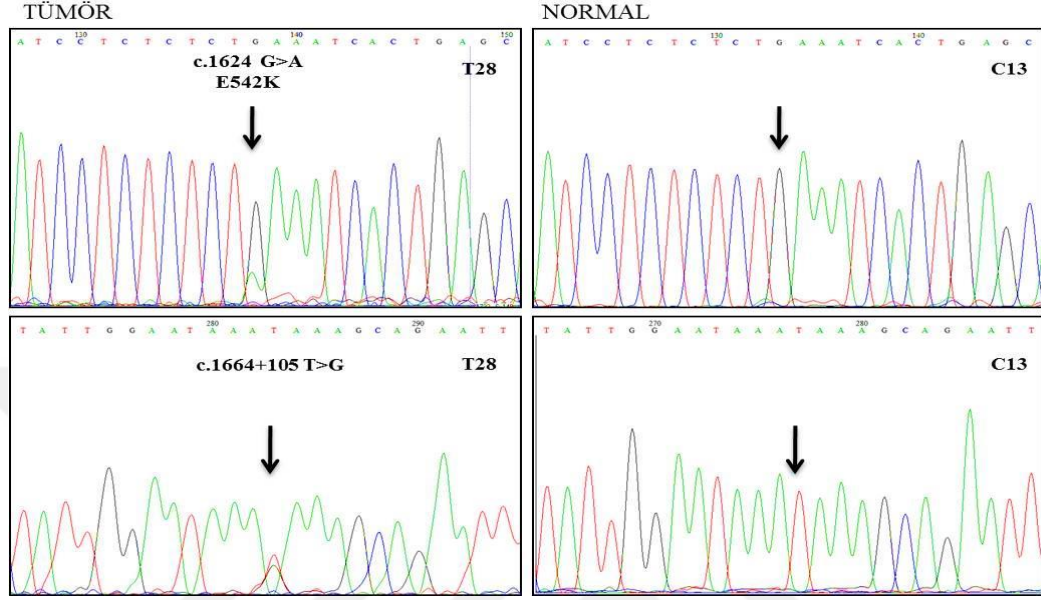
Şekil 3. 26. T18 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların TC12 kodlu tümör kontrol ve C11 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.

SeqScape Software’inde T22 kodlu tümör olgusunun analizi sonrasında exon 9 bölgesinde c.1634 A>C (E545A) ve c.1658_1659delGTİnsC (S553Thr) mutasyonları tespit edilmiştir. Tespit edilen mutasyonlar, TC15 kodlu tümör kontrol ve C12 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılarak Şekil 3.27.’de gösterilmiştir.



Şekil 3. 27. T22 kodlu tümör olgusunun exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların TC15 kodlu tümör kontrol ve C12 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.

SeqScape Software’inde T28 kodlu tümör olgusunun analizi sonrasında exon 9 bölgesinde c.1624 G>A (E542K) ve c.1664+105 T>G mutasyonları tespit edilmiştir. Tespit edilen mutasyonlar, C13 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılarak Şekil 3.28.’de gösterilmiştir.



Şekil 3. 28. T28 kodlu tümör olgusunun exon 9 ve intron 9 bölgelerinde tespit edilen mutasyonların C13 kodlu kontrol grubuyla karşılaştırılmış görüntüsü.

3.7. Biyoinformatik Analiz

Deneysel aşamalar sonucunda toplam 80 olgunun PIK3CA geninin exon 9 ve exon 20 bölgelerine ait 240 adet sekans dosyası elde edilmiştir. Elde edilen sekans dosyalarının mutasyon analizi SeqScape v.2.6 Software’inde yapılmıştır. Software’in mutasyon raporlama kısmında tespit edilen tekli nükleotid değişim bölgeleri yani SNP bölgeleri daha sonra Sequencing Analysis v5.3.1 de ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. İncelenen bölgelerdeki nükleotid değişimleri ve bunun sonucunda meydana gelecek olan amino asit değişimleri Ensembl ve NCBI veri tabanlarında NM_006218 genbank numaralı PIK3CA gen sekansı üzerinde araştırılmıştır. Ayrıca amino asit değişimleri NP_006209 numaralı referans sekansı üzerinde araştırılmıştır. Belirlenen mutasyonlar ve buna bağlı olarak değişen amino asit sekansları tespit edilmiştir.

4. TARTIŞMA

Kolon ve rektum, sindirim sisteminin önemli bir parçası olan kalın bağırsığı oluşturur. Kalın bağırsak çekum, kolon ve rektum olmak üzere 3 kısımdan meydana gelir. Kolon yapısı ise çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon olmak üzere 4 kısımdan oluşmaktadır. Rektum ise sigmoid kolon ile anüs arasında yer almaktadır.

Hücre büyümesi ve çoğalması normalde vücut ihtiyacı doğrultusunda kontrol altında tutulurken, hücrelerin bu kontrolden çıkarak büyüme, bölünme, çoğalma ve yayılma yoluna girmesiyle tümörler meydana gelmektedir. Bu tümörler iyi ve kötü huylu olmakla beraber kanser gelişiminde kötü huylu tümörler ön plandadır (www.kanser.gov.tr). Kanser, anormal hücre çoğalmasına yol açan hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenleyen genin kontrolü ve aktivitesi ile ilişkilidir. Bu kanserle ilgili genlerin normal hücre çoğalması üzerinde zıt etkileri vardır ve bazen bu genlerdeki değişiklikler kanser gelişiminde önemli etkilere sahip olabilmektedir (Weinberg., 1996).

Kolon ve rektum kısımlarından herhangi birinde meydana gelen kanserleşme kolorektal kanser olarak adlandırılmaktadır. Kolorektal kanser hem Batı hem de Asya ülkelerinde en yaygın olarak görülen malignitelerden biridir (Chen vd., 2014). Kolorektal kanser 2012 yılında dünya çapında, erkeklerde üçüncü (746.000 vaka'da %10), kadınlarda ise ikinci (614.000 vaka'da %9,2) en yaygın olarak görülen kanser türü olmuştur (Kawazoe vd., 2015). KRK, her yıl 1 milyondan fazla yeni vaka ile batı dünyasında en sık olarak görülen kanser türlerinden biridir. Primer kolorektal tümörlerin metastazı, doğrudan hastanın yaşamı ile bağlantı olup hasta ölümlerinin yaklaşık olarak %90'ını oluşturmaktadır (Koelzer vd., 2015).

Kanserin moleküler temelini anlaşılmaması adına üzerinde en çok çalışma yapılan kanser türlerinden bir tanesi de kolorektal kanserdir ve bu kanser türünün heterojen ve çok karmaşık bir kanser modeli olduğu belirtilmiştir (Takayama vd., 2006). Kolorektal karsinogenez, genetiksel yapıdaki birden fazla moleküler değişimin meydana getirdiği karmaşık bir karsinogenez modelidir.

KRK gelişimi, diğer kanser türlerinde olduğu gibi düzenleyici genlerin fonksiyonları üzerindeki değişiklikler ve genomik kararsızlıkla ilişkilidir (Ashktorab vd., 2010). Kolorektal kanser gelişimi üzerinde etkili olan genetik faktörler hakkında yapılan çalışmalar sonucunda, %35 oranında bu faktörlerin kanser gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir (Lichtenstein vd., 2000). Kolorektal kanserlerin yaklaşık olarak %15'i ailesel, %10'u kalıtsal ve %75'i ise sporadik olarak oluşmaktadır (Lynch vd., 2006).

Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) hücre proliferasyon, yayılma ve hayatta kalması için sinyal yollarının başlatılmasında kritik bir lipid kinazdır. Sınıf IA fosfatidilinositol 3-kinazlar heterodimerik bir lipit kinaz ailesi olup farklı reseptör tirozin kinazlara bir dizi yanıt olacak şekilde hücre içerisindeki birçok süreci düzenler (Hamilton vd., 2000). PI3K'lar hücre proliferasyonu, hayatta kalması, metabolizması ve motilitesi dahil olmak üzere çeşitli hücresel fonksiyonları düzenlemektedir (Foukas vd., 2006).

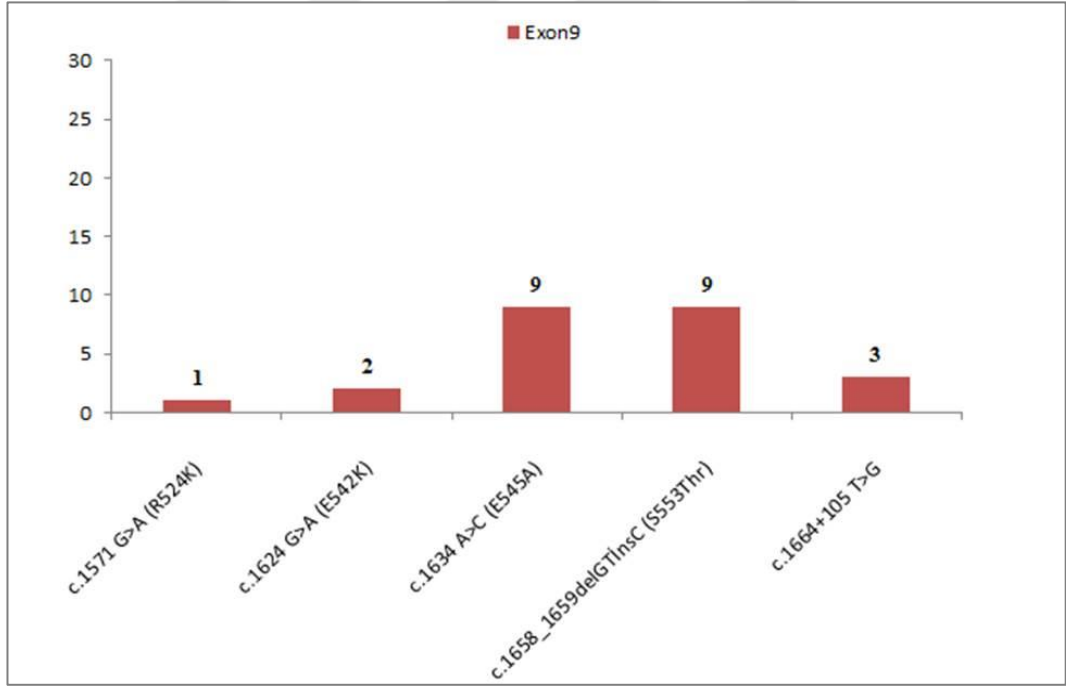
PIK3CA, 34 kb'lık bir gen olup 20 exondan oluşur, 1068 amino asitten oluşan 124kDa'luk p110α proteinini kodlar ve 3.kromozomun 3q26.3 bölgesinde lokalizedir (Ligresti vd., 2009). PIK3CA geni hücre proliferasyonu, sağkalım, çoğalma, göç ve morfolojisi de dahil olmak üzere hücresel yanıtları yöneten PI3K'nın katalitik alt ünitesi olan p110α proteinini kodlar (Miled v., 2007; Bader vd., 2006). Birçok raporda PIK3CA geni üzerinde exon 9 ve exon 20 bölgelerindeki hotspot mutasyon bölgeleri bildirilmiştir (Samuels vd., 2004). p110α C-terminal kinaz exon 20 tarafından kodlanır ve bu alandaki mutasyonlar enzimatik aktiviteyi uyarabilmektedir. p110α helikal domaini ise exon 9 tarafından kodlanmaktadır ve bu alandaki mutasyonlar p110α katalitik alt birim ve p85 N-terminal SRC Homoloji-2 (SH2) etki alanı arasında önleyici etkileşimleri zayıflatır (Vogt vd., 2007; Zhao ve Vogt, 2008; Huang vd., 2007). Otomatik DNA dizileme yöntemleri kullanılarak, PI3K genlerinin insan kanserinde mutasyona uğramış olduğu gösterilmiştir (Ligresti vd., 2009). Tümörler genellikle genetik olarak etkilenmiştir ve onkogenlerde somatik mutasyonlar olduğu iyi bilinmektedir.

PI3K / AKT sinyal yolu daha önceden karsinogeneze dahil olmuştur; son birkaç yıl içindeki kanıtlar, insan kanserlerinde PI3K'in katalitik alt birimi olan PIK3CA'nın hayati bir rolü olduğunu önermiştir (Phillips vd., 2006; Barbareschi vd., 2007). Literatür taramaları sonucunda PIK3CA geninin çeşitli insan kanseri tiplerinde mutasyona uğradığı ve kanser gelişiminde etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca PIK3CA mutasyonlarının yoğun olarak exon 9 ve exon 20 bölgelerinde kümелendiği bildirilmiştir.

Bu bulgular sonucunda tez çalışması kapsamında, Muğla bölgesindeki kolorektal kanserli hastalarda PIK3CA geninin exon 9 ve exon 20 onkojenik hotspot mutasyon bölgelerinin sıklığının belirlenmesi ve kolorektal kanser gelişimi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla birlikte bu tez çalışmasında Muğla bölgesinde, Muğla Sıtkı Koçman Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne gelerek kolorektal kanser tanısı almış olan 30 adet hastaya ait parafin bloklara gömülü doku örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada kontrol grubu olarak, bu 30 kolorektal kanserli hastanın 20 tanesine ait sağlıklı kolon dokusu (tümör kontrol grubu) ve 30 adet de kolonunda herhangi bir tümörleşme olmayan hastalara ait parafin bloklara gömülü doku örneği kullanılmıştır. Çalışmada 30 adet tümör, 20 adet tümör kontrol ve 30 adet de normal kontrol grubu olmak üzere 80 tane parafin bloklara gömülü doku örneği kullanılmıştır. 80 adet doku örneğinden genomik DNA izolasyonu, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit ile yapılmıştır. Daha sonra her bir DNA örneğinde, PIK3CA geninin exon 9 ve exon 20 bölgeleri ilgili primerler ile PCR'da çoğaltılmıştır. Çoğaltılan gen bölgelerine ait purifikasyon işlemi ExoSAP enzimi ile yapılmıştır. 80 adet olguya ait 240 adet PCR ürününün daha sonra BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) kullanılarak sekans PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Sekans ürünlerinin purifikasyon işlemi Sephadex ile yapıldıktan sonra ürünler, Sanger sekanslama metodu kullanılarak Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazında sekanslama işlemine tabi tutulmuş ve ilgili gen bölgelerine ait DNA dizileri (sekans) çıkarılmıştır. 80 adet olguya ait toplam 240 adet sekans dosyası Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazına ait Sequencing Analysis v.5.3.1 ve SeqScape v.2.6 Software'lerinde analiz edilerek PIK3CA genine ait exon 9 ve exon 20 bölgeleri üzerindeki mutasyon bölgeleri tespit edilmiştir.

Daha sonra bu mutasyon bölgelerindeki nükleotid değişimleri ile amino asit değişimleri Ensembl ve NCBI veri tabanlarında biyoinformatik analizler ile tespit edilmiştir.

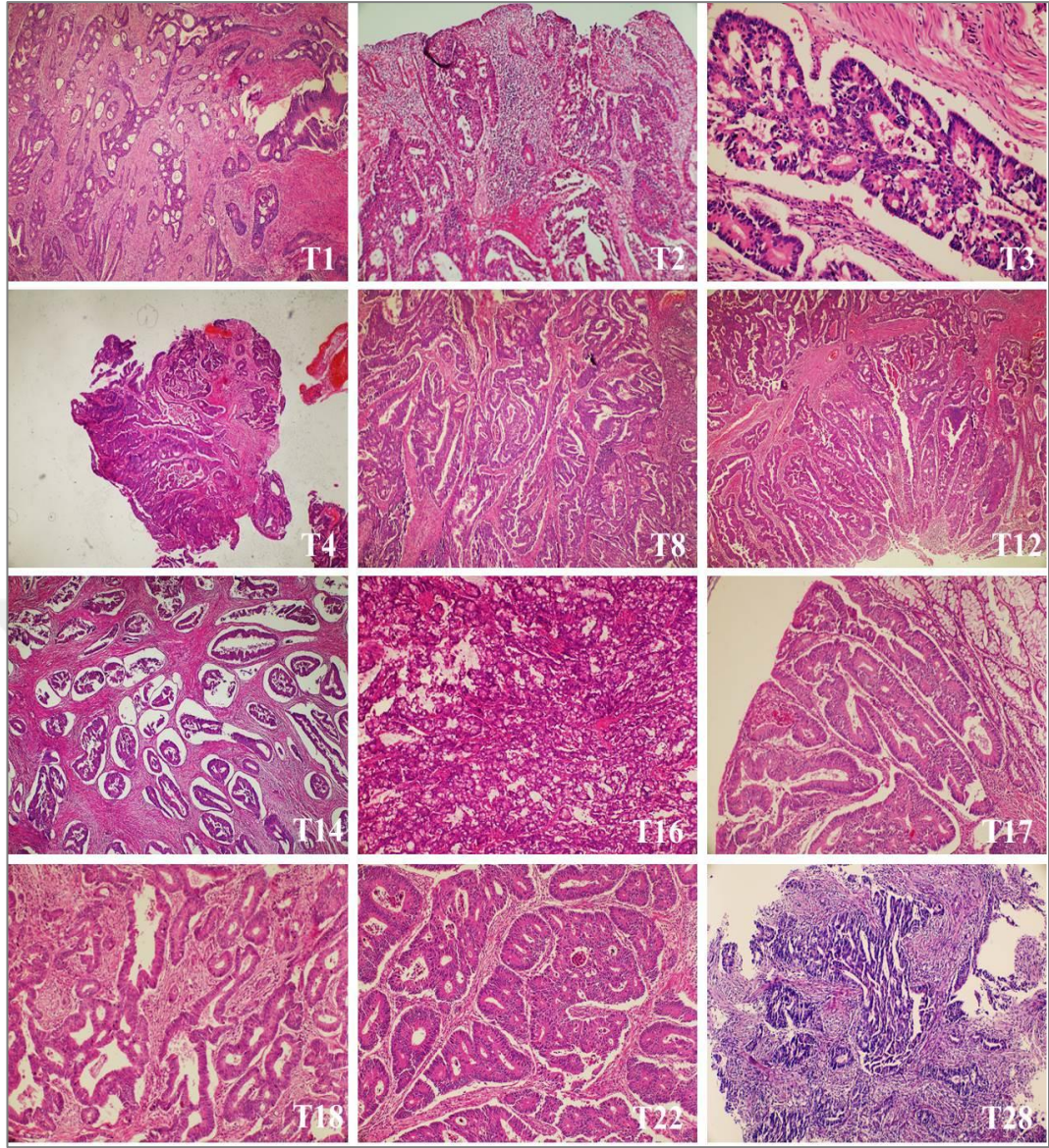
Yapılan mutasyon ve biyoinformatik analizler sonucunda, 30 adet kolorektal tümörlü hastanın 12 tanesinin PIK3CA geninin exon 9 bölgesinde anlamlı mutasyonlar tespit edilirken, exon 20 bölgesinde herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir. Ayrıca tümör kontrol (TC) ve normal kontrol (C) gruplarında yapılan analizler sonucunda PIK3CA geninin exon 9 ve exon 20 bölgelerinde herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir. Analizler sonucunda 1 hastada c.1571 G>A (R524K), 2 hastada c.1624 G>A (E542K), 3 hastada c.1664+105 T>G, 9 hastada ise c.1634 A>C (E545A) ve c.1658_1659delGTİnsC (S553Thr) mutasyon birlikteliği tespit edilmiştir (Şekil 4.1.). Toplam 12 hastada tespit edilen mutasyonlar Çizelge 4.1.'de detaylı olarak verilmiştir. Ayrıca bu 12 hastaya ait kolorektal tümörlü kolon dokularının, hematoksilin eozin ile boyanmış preparatlarının mikroskopik görüntüleri Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4. 1. Kolorektal tümörlü 12 hastanın PIK3CA geninin exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların dağılımı.

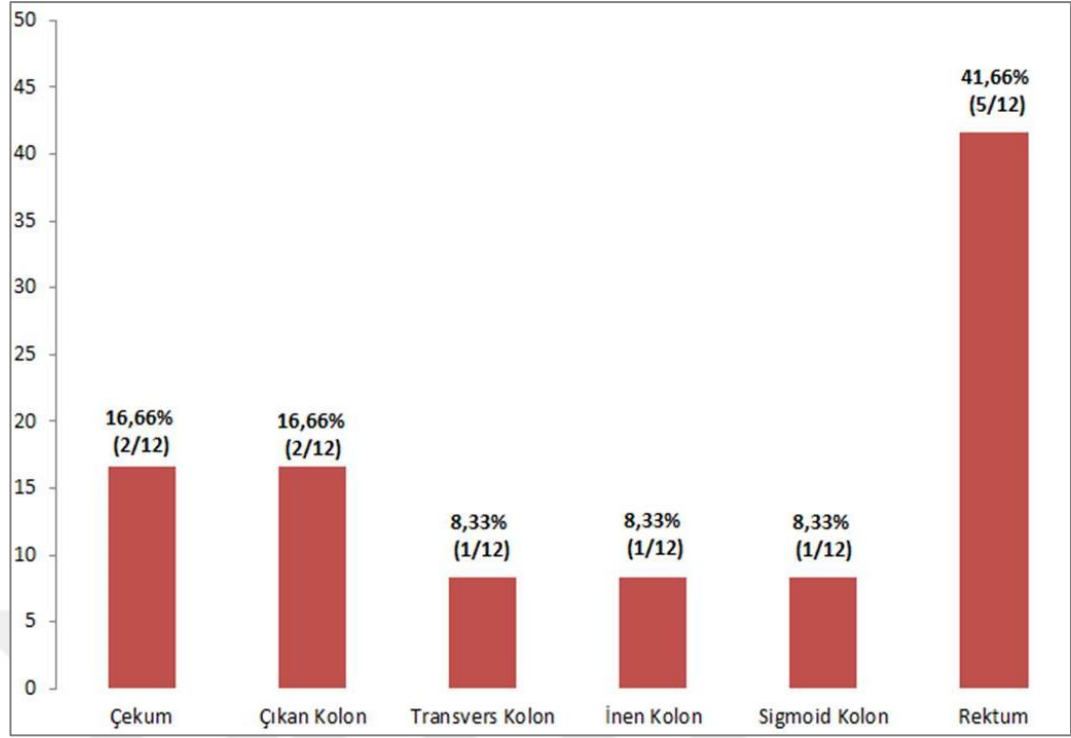
Çizelge 4. 1. Kolorektal kanserli hastalarda tespit edilen mutasyonlar.

Örnek Kodu	Yaş/ Cinsiyet	Patoloji	Bölge	Nükleotid	Protein	Referans Numarası
T1	73 / ♂	Adenokarsinom	Exon 9	c.1571 G>A c.1634 A>C c.1658_1659delGTİnC	R524K E545A S553Th r	rs104885999 rs121913274 rs587777795
T2	44 / ♂	Adenokarsinom	İntron 9	c.1664+105 T>G	-	rs17849071
T3	75 / ♂	Adenokarsinom	Exon 9	c.1634 A>C c.1658_1659delGTİnC	E545A S553Th r	rs121913274 rs587777795
T4	72 / ♂	Adenokarsinom	Exon 9	c.1634 A>C c.1658_1659delGTİnC	E545A S553Th r	rs121913274 rs587777795
T8	60 / ♀	Adenokarsinom	Exon 9	c.1634 A>C c.1658_1659delGTİnC	E545A S553Th r	rs121913274 rs587777795
T12	47 / ♀	Adenokarsinom	İntron 9	c.1664+105 T>G	-	rs17849071
T14	83 / ♀	Adenokarsinom	Exon 9	c.1634 A>C c.1658_1659delGTİnC	E545A S553Th r	rs121913274 rs587777795
T16	74 / ♂	Adenokarsinom	Exon 9	c.1634 A>C c.1658_1659delGTİnC	E545A S553Th r	rs121913274 rs587777795
T17	78 / ♂	Adenokarsinom	Exon 9	c.1634 A>C c.1658_1659delGTİnC	E545A S553Th r	rs121913274 rs587777795
T18	80 / ♂	Adenokarsinom	Exon 9	c.1624 G>A c.1634 A>C c.1658_1659delGTİnC	E542K E545A S553Th r	rs121913273 rs121913274 rs587777795
T22	75 / ♀	Adenokarsinom	Exon 9	c.1634 A>C c.1658_1659delGTİnC	E545A S553Th r	rs121913274 rs587777795
T28	54 / ♀	Adenokarsinom	Exon-İntron 9	c.1624 G>A c.1664+105 T>G	E542K -	rs121913273 rs17849071



Şekil 4. 2. PIK3CA geninde mutasyonlar tespit edilen kolorektal tümörlü hastalara ait hematoksilin eozin ile boyanmış preparatların mikroskopik görüntüsü.

12 kolorektal tümörlü hastada tespit edilen mutasyonların kolon içerisindeki dağılımları göre Şekil 4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4. 3. Kolorektal tümörlü 12 hastanın exon 9 bölgesinde tespit edilen mutasyonların kolon içerisindeki % dağılımı.

Zhu ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada 60 adet kolorektal kanserli hastada PIK3CA gen mutasyon taraması yaparak, mutasyonların yoğun olarak exon 9 (13,3 %) ve exon 20 (8,3 %) bölgelerinde kümелendiğini ve normal dokularda herhangi bir mutasyon olmadığını tespit etmişlerdir. Exon 9 bölgesinde E545A ile sonuçlanan c.1633 G>A ve exon20 bölgesinde H1047 ile sonuçlanan c.3140 A>G mutasyonlarının tanımlandığını bildirmişlerdir. Buna bağlı olarak kolorektal kanserli hastaların metastatik lezyonları arasında PI3K proteininin ifadesinde farklılık bulmuşlardır. PI3K'nın pozitiflik oranının, primer tümörlere göre metastazda daha yüksek olduğunu ve bu durumun KRK gelişimi, ilerlemesi ve metastazıyla ilgili olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Zhu vd., 2012).

Omata ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada PIK3CA mutasyonlarının lipid kinaz aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Fosfatidilinositol 3-kinazın p110a katalitik alt birimi kodlayan PIK3CA genindeki mutasyonları kolorektal kanserli hastalarda taramışlar ve tespit edilen mutasyonların çoğunun helikal domaini kodlayan exon 9 ve kinaz domainini kodlayan exon 20 bölgesinde kümелendiğini bildirmişlerdir.

Çalışma sonucunda E542K, E545K ve H1047R ile sonuçlanan hotspot mutasyonların tümünde yüksek enzimatik aktivite gözlemlenmiştir (Omata vd., 2005).

Campbell ve arkadaşları 2004 yılında, PIK3CA'nın tüm kodlayıcı ekzon mutasyonları için, yumurtalık, göğüs ve kolorektal kanser olmak üzere toplamda 284 primer tümör örneğini taramışlardır. Mutasyon durumu ve histolojik alt gruplar arasında açık bir ilişki bildirilmesine rağmen primer epitelyal over kanserlerinde sadece %6'lık bir somatik mutasyon bulunduğu rapor edilmiştir. Ek olarak, kolorektal kanserlerde % 18 ve meme kanserlerinde % 40 PIK3CA mutasyon sıklığı bildirilmiştir (Campbell vd., 2004).

Broderick ve arkadaşları 285 beyin tümöründen; anaplastik oligodendrogliomlarda % 14, medulloblastomlar ve glioblastomalarında % 5 ve anaplastik astrositomlarda % 3 oranında PIK3CA mutasyonlarını tespit etmişlerdir (Broderick vd., 2004).

Oda ve arkadaşları 66 endometriyal karsinom hastasında PIK3CA geni üzerinde 24 (%36) mutasyon tespit etmişler ve yüksek frekanslı PIK3CA/PTEN mutasyonlarının bir arada olduğunu bildirmişlerdir. PIK3CA mutasyonlarının PIK3CA / PTEN yolunda meydana getirdiği değişiklikler nedeniyle tümör gelişiminde önemli bir rol oynayabileceğini ve tümörü olan hastalardaki PTEN mutasyon oranının(%46) tümörü olmayan hastalardaki PTEN mutasyonlarına (%24) kıyasla daha sık olduğunu bildirmişlerdir (Oda vd., 2005).

Qiu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada baş ve boyun yassı hücreli karsinomlarda (HNSCC) PIK3CA mutasyonlarını bildirmişler ve 38 HNSCC örneğinde, PIK3CA somatik mutasyonların %75'den fazlasının helikal (exon 9) ve kinaz (exon 20) domainlerde kümелendiğini rapor etmişlerdir (Qiu vd., 2006).

Kozaki ve arkadaşları insan oral skuamöz karsinom (OSCC) hücre hatları ve primer OSCC tümörlerinde PIK3CA mutasyonlarını araştırmış ve PIK3CA genindeki exon 9 ve exon 20 amplifikasyonlarında mutasyonlar tespit etmişlerdir. exon 9 ve exon 20 bölgelerindeki mutasyon oranının OSSC hücre hattı tümörlerinde %21, OSSC primer tümörlerinde %7,4 olduğunu bildirmişlerdir (Kozaki vd., 2006).

Kolorektal kanserde PIK3CA mutasyonları; Iida ve arkadaşları tarafından 164 hastada %12, Hsieh ve arkadaşları tarafından 182 hastada %12, Whitehall ve arkadaşları tarafından 829 hastada %14, Tian ve arkadaşları tarafından 381 hastada %12, Liao ve arkadaşları tarafından 1170 hastada %16, Garrido-Laguna ve arkadaşları tarafından 238 hastada %15, Ogino ve arkadaşları tarafından 450 hastada %18, Nosho ve arkadaşları tarafından 590 hastada %15, Kato ve arkadaşları tarafından 158 hastada %11 oranında bulduklarını bildirmişlerdir (Rosty vd., 2013).

PI3K ile p110a katalitik alt birimi arasında gen kopya sayısı sıklıkla yumurtalık kanserlerinde artar, artan PIK3CA transkripsiyonu, p110a protein ekspresyonu ve PI3K aktivitesi ile sonuçlanır (Shayesteh vd., 1999).

PIK3CA mutasyonları, AKT sinyal yolağının aktivasyonunda ve kolorektal karsinogenezde önemli bir rol oynamaktadır (Ogino vd., 2009). Son bulgular, tümörigenezinde PI3K katılımını desteklemektedir. PTEN mutasyonu ve aşırı Akt gen amplifikasyonu içeren PI3K / Akt yolağının sapkın bir aktivasyonu, çeşitli insan kanserlerinde rol oynar (Vivanco ve Sawyers, 2002; Luo vd., 2003). Bazı mutasyonlar p85 bağlanma domaini ve C2 domainlerinde bildirilmesine rağmen, insan kanserlerinde rapor edilen PIK3CA mutasyonlarının çoğu helikal ve kinaz domainleri üzerinde olduğu bildirilmiştir (Samuels vd., 2004).

E542K ve E545K helikal domain hotspot mutasyonları, yüksek lipid kinaz aktivitesi göstermektedir (Omata vd., 2005). Memeli hücrelerinde, p110a'nın monomer aktivitesi 30 °C'de p85a tarafından inhibe edilerek p110a stabil hale getirilir. Buna karşılık p85a 37 °C'de p110a tarafından bir aktivatör olarak kabul edilir ve lipid kinaz aktivitesinde artış meydana gelir (Yu vd., 1998).

Hotspot mutasyon olarak E542 ve E545 helikal domainde (exon 9), H1047 ise kinaz domainde (exon 20) çoğunlukla bulunmuştur. E542 ve E545 sık olarak Lizin'e değiştirilirken, H1047 ise sıklıkla Arjinin'e değiştirilir. p110a ve p85a arasında veya p110a kinaz domaini arasındaki ara yüzlerde, p85 kinaz aktivitesinin düzenlemesi ya da enzimin katalitik aktivitesini etkileyen katalitik alt birim içinde gerçekleşen mutasyonların çoğu PI3K, p110a katalitik alt birim ve p85a düzenleyici alt birim arasındaki karmaşık kristal yapıyı ortaya çıkarmıştır (Huang vd., 2007).

Bu mutasyonlar, proteinin enzimatik fonksiyonunda bir artışına neden olarak birincil tavuk embriyo fibroblastları ve NIH3T3 hücreleri içinde eksprese edildiği zaman, onkogenik transformasyona neden olduğu gösterilmiştir (Kang vd., 2005).

PI3K'nın p110 α katalitik alt birimini kodlayan PIK3CA geninde gözlenen yüksek frekanslı somatik mutasyonlar sıklıkla helikal domaini kodlayan exon 9 ve kinaz domaini kodlayan exon 20 üzerinde tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar tercihen yüksek ölçüde korunmuş bölgeleri etkiler ve bu yüzden kritik fonksiyonel öneme sahiptirler. E542K, E545K ve H1047R mutasyonları lipid kinaz ve gelişmiş enzimatik aktive göstererek AKT'nin yüksek oranda fosforillenmesini sağlarlar (Kang vd., 2005).

PIK3CA mutasyonlarının % 80'inden fazlası exon 9 (helikal domain) ve exon 20 (kinaz domain)'de meydana gelir. Moleküler mekanizmalar tarafından bu mutasyonların kinaz aktivitesini artırarak PI3K'nın yapısını değiştirdiği yoğun araştırma konusu olmuştur. p110 α alt birimi beş domainden meydana gelir: p85 alt birimine bağlanan bir adaptör bağlama domaini (ABD), bir Ras-bağlama domaini (RBD), bir C2 domaini, helikal domain ve bir kinaz domaini içerir. (Vanhaesebroeck ve Waterfield, 1999; Cantley, 2002). p110 α helikal domaininde meydana gelen onkogenik mutasyonlar (E542K ve E545K) ile ilgili olarak, bu mutasyonların p110 α helikal domain ve p85 α domaini arasındaki nSH2 ara yüzündede meydana geldiği ileri sürülmüştür. Ayrıca, biyokimyasal çalışmalar Glu542, Glu545, Lys379 ve Arg340 amino asitlerinin p85 α nSH2 domaininde etkileşim içinde olduğu gösterilmiş, bu bölgelerin mutasyona uğraması durumunda katalitik alt birim üzerindeki düzenleyici birim olan p85a'nın yapısını değiştirebileceği ortaya konmuştur (Cantley, 2002).

PIK3CA aktif mutasyonları kolorektum, mide, göğüs, beyin, yumurtalık, karaciğer ve akciğer neoplazmalarında bulunmuştur (Samuels vd., 2004; Campbell vd., 2004). Bu mutasyonlardan kodon 542 ve 545 exon 9 helikal domaini, kodon 1047 ise exon 20 kinaz domaininde olmak üzere 2 hotspot bölgede yoğunlaşmıştır. Her iki bölge mutasyonlarında sonuç olarak ortotopik modellemelere göre hücre hatlarında transformative enzim fonksiyonlarında bir artış vardır (Guo vd., 2007; Samuels vd., 2005).

Kolorektal karsinomlar için, PIK3CA mutasyon sıklığının % 7 - % 32 arasında ve exon 9 bölgesindeki G>A transversiyonlarının en sık görülenler olduğu bildirilmiştir (Nosho vd., 2008; Prenen vd., 2009; Herreros vd., 2011).

Samuels ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 234 kolon kanser hastasında %32 oranında PIK3CA mutasyonu tanımlamışlar, bu mutasyonlarında %47'sinin helikal (exon 9) ve %33'ünün de kinaz (exon 20) domaininde tespit edildiğini bildirmişlerdir (Samuels vd., 2004).

PIK3CA mutasyonu ve sağkalım arasındaki ilişki, mutasyon türü veya hasta grubundaki farklılıklar ile birlikte önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Iida ve arkadaşları ile Kato ve arkadaşları tüm PIK3CA mutasyonlarının tüm kolorektal karsinomlarda kötü sağ kalıma, Liao ve arkadaşları exon 9 ve exon 20 mutasyonlarına sahip tümörlerde kötü sağ kalıma, Farina Sarasquesta ve arkadaşları sadece exon 20 mutasyonlarına sahip tümörlerde kötü sağ kalıma, Ogino ve arkadaşları ise sadece yabanıl tip KRAS mutasyonuna sahip tümörlerde kötü sağ kalıma neden olduğunu rapor etmişlerdir (Rosty vd., 2013).

E545A mutasyonu kolorektal kanser de dahil olmak üzere birçok kanser tipinde bildirilmiştir (Horn vd., 2008; Heartman vd.,2010; Lee vd., 2010). PIK3CA geninin exon 9 bölgesi üzerindeki E545A ve S553Tfs mutasyon birlikteliği Cowden sendromlu hastalarda bildirilmiştir. Ayrıca bu mutasyonların kinaz aktivitesinde bir artışa neden olduğunu da bildirmişlerdir (Orloff vd., 2013). Exon 9 helikal domaininde yer alan R524K mutasyonu literatürde kolorektal kanser ve orofaringeal kanser hastalarında tanımlanmış olup kinaz aktivitesi üzerine etkisi bilinmemektedir (Berg vd., 2010; Chiosea vd., 2010). İntron 9 bölgesi üzerindeki c.1664+105 T>G hotspot mutasyonu ileri evredeki oral skuamöz hücreli karsinomlarda (OSCC) bildirilmiştir (Shah vd., 2015). Pang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada meme tümörlerinde c.1664+105 T>G mutasyonu, p53 protein birikimi ile ilişkili bulunmuştur (Pang vd., 2014).

Bu tez çalışması sonucunda PIK3CA geninin exon 9 bölgesinde, 1 hastada c.1571 G>A (R524K) heterozigot, 2 hastada c.1624 G>A (E542K) heterozigot, 3 hastada c.1664+105 T>G heterozigot, 9 hastada ise c.1634 A>C (E545A) heterozigot ve c.1658_1659delGTİnsC (S553Thr) heterozigot mutasyon birlikteliği tespit edilmiştir.

Toplam 12 kolorektal tümörlü vakada tespit edilen mutasyonların tamamı helikal domain (exon 9) üzerinde kümelenmiştir. Kinaz domaini (exon 20) üzerinde ise herhangi bir mutasyon gözlemlenmemiştir. Ayrıca çalışmaya alınan 20 tümör kontrol ve 30 normal kontrol olmak üzere toplam 50 adet kontrol grubunun exon 9 ve exon 20 bölgelerinde herhangi bir mutasyon gözlemlenmemiştir. Tespit edilen mutasyonlar kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında sadece tümörlü olgularda mutasyonların gözlemlenmesi bu mutasyonların somatik mutasyonlar olduğunu göstermektedir. R524K mutasyonunda 524. kodonda arjinin amino asitinden lizin amino asitine, E542K mutasyonunda 542. kodonda glutamik asitten lizin amino asitine, E545A mutasyonunda 545. kodonda glutamik asitten alanin amino asitine ve S553Thr mutasyonunda 553. kodonda serin amino asitinden treonin amino asitine bir değişim vardır. c.1664+105 T>G mutasyonu ise intron 9 bölgesinde olduğundan dolayı amino asit üzerine bir etkisi yoktur.

Mutasyonlar sonucu bir kodondaki amino asit sekans değişikliği protein işlevi üzerinde önemli bir etkiye sahip olması mümkündür. Bu mutasyonların biyolojik ve biyokimyasal özellikleri ile ilgili daha fazla araştırma yapılması PIK3CA'nın kinaz aktivitesindeki değişimlerin etkilerini araştırmak için önemlidir. Sonuç olarak Muğla bölgesindeki kolorektal kanser hastalarında PIK3CA gen mutasyon oranı %40 şeklinde bulunmuştur (12/30). Buna bağlı olarak bu çalışmanın bulguları, PIK3CA mutasyonlarının Muğla Bölgesindeki kolorektal kanserli hastalarda sık olduğunu göstermiştir. Elde ettiğimiz sonuçların, literatür taramaları sonucunda lipid kinaz aktivitesini üzerinde artırıcı bir etkisinin olduğu düşünülmektedir. Sonuçlarımız, kanserle ilişkili PIK3CA mutasyonlarının lipid kinaz aktivitesinin üst regülasyonu ile tümör oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermektedir. PIK3CA tarafından kodlanan p110a proteini PI3K sinyalizasyon yolağı için önemli bir bileşendir. PIK3CA geninin mutasyona uğraması durumunda bu protein sürekli ifade edilerek PI3K sinyal yolağının sürekli aktif olmasına neden olmaktadır. Kolorektal karsinogenezde PI3K sinyal yolağı en yaygın mekanizmalardan biridir. PI3K sinyal yolunun sık olarak kolon kanser hücrelerinde aktive olduğu önceki çalışmalarla rapor edilmiştir. PIK3CA'da meydana gelecek olan mutasyonlar bu genin kodladığı p110a proteini üzerinde etkili olmakla birlikte, kanser gelişimine de katkı sağladığı düşünülmektedir.

Proteinlerin mutasyona uğramış formları tümör hücrelerine özeldir ve PIK3CA gibi onkogenik potansiyeli olan mutasyona uğramış kinazlar, kanser tedavisi için ideal ilaç hedefleridir. Bu PI3K kanser spesifik mutasyonları, antikanser ilaçlarının geliştirilebilmesi için spesifik küçük molekül inhibitörleri adına ideal bir hedef olabileceğini kanıtlamaktadır. PIK3CA geni tarafından kodlanan p110 α , hücresel fizyoloji için kritik bir bileşen olup, mutasyona uğramış olması durumunda küçük molekül inhibitörleri ile PIK3CA’da ortaya çıkabilecek istenmeyen etkileri minimize edebilir.



KAYNAKLAR

- Ahsan, H., Neugut, Al., Garbowski, G. (1998) Family history of colorectal adenomatous polyps and increased risk for colorectal cancer, *Ann Intern Med*, 128: 900-905.
- Ashktorab, H., Schaffer, A.A., Daremipouran, M., Smoot, D.T., Lee, E., Brim, H. (2010) Distinct genetic alterations in colorectal cancer, *PLoS One*, 5(1): e8879.
- Bacon, H.E., Eisenberg, S.W. (1971) Papillary adenoma or villous tumor of the rectum and colon, *Ann Surg*, 174: 1002-1008.
- Bader, A.G., Kang, S., Vogt, P.K. (2006) Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 1475–1479.
- Barbareschi, M., Buttitta, F., Felicioni, L., Cotrupi, S., Barassi, F., Del Grammastro, M., Ferro, A., Dalla Palma, P., Galligioni, E., Marchetti, A. (2007) Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas, *Clin Cancer Res*, 13: 6064-6069.
- Beaton, H., Homan, W., Dineen, P. (1981) Gastrointestinal carcinoids and the malignant carcinoid syndrome, *Surg Gynecol Obstet*, 152:268-272.
- Bellacosa, A., Chan, T.O., Ahmed, N.N., vd. (1998) Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain, *Oncogene*, 17: 313-25.
- Berg, M., Danielsen, S.A., Ahlquist, T., vd. (2010) DNA sequence profiles of the colorectal cancer critical gene set KRASBRAF- PIK3CA-PTEN-TP53 related to age at disease onset, *PLoS One*, 5:e13978.
- Birgisson, H., Edlund, K., Wallin U., Pahlman, L., Kultima, H.G., Mayrhofer, M., Micke, P., Isaksson, A., Botling, J., Glimelius B., Sundström, M. (2015) Microsatellite instability and mutations in BRAF and KRAS are significant predictors of disseminated disease in colon cancer, *BMC Cancer*, 15:125, DOI 10.1186/s12885-015-1144-x.

- Bozfakioğlu, Y., Müslümanoğlu, M. (1997) Cerrahi Gastroenteroloji, Değerli, Ü., Bozfakioğlu, Y. (editörler), *Kolon hastalıkları*, 4. baskı, İstanbul Nobel tıp Kitabevi, 142-168.
- Broderick, D.K., Di, C., Parrett, T.J., Samuels, Y.R., Cummins, J.M., McLendon, R.E., vd. (2004) Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas and medulloblastomas, *Cancer Res*, 64:5048-50.
- Burt, R.W., DiSario, J.A., Cannon-Albright, L. (1995) Genetics of colon cancer: Impact of inheritance on colon cancer risk, *Annu Rev Med*, 46:371.
- Burt, R.W. (2000) Colon cancer screening, *Gastroenterology*, 119(3):837–853.
- Büyükdogan, M. (2009) Kolorektal kanserde genetik ve etyolojik faktörler, Selçuk Üniversitesi Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi, *Konya Selçuk Tıp Dergisi*, 25 (3):171-180.
- Campbell, I.G., Russell, S.E., Choong, D.Y., Montgomery, K.G., Ciavarella, M.L., Hooi, C.S., vd. (2004) Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer, *Cancer Res*, 64:7678-81.
- Cantley, L.C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway, *Science*, 296, 1655–1657.
- Chen, J., Guo, F., Shi, X., Zhang, L., Zhang, A., Jin, H., He, Y. (2014) BRAF V600E mutation and KRAS codon 13 mutations predict poor survival in Chinese colorectal cancer patients, *BMC Cancer* , 14:802 ,1471-2407/14/802.
- Chiosea, S.I., Grandis, J.R., Lui, V.W., vd. (2013) PIK3CA, HRAS and PTEN in human papillomavirus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma, *BMC Cancer*, 13:602.
- Christine, A., Lacobuzio, D., Elizabeth, M. (2005) Epithelial neoplasms of the colorectum, In: Gastrointestinal and Liver Pathology, *Churchill Livingstone Elsevier*, 367-394.
- Dobrucalı, A. (2003) Kolorektal kanserde epidemiyoloji, sınıflama, etyopatogenez, kolon, rektum ve anal bölge hastalıkları, Alemdaroğlu, K., Akçal, T., Buğra, D. (editörler), Ajans plaza Ltd İstanbul, s:295-412.

- Doğan, L., Güç, D. (2004) Sinyal İletimi Mekanizmaları ve Kanser, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 34-42.
- Doğusoy, G. (2003) Kolon Kanserinin Patolojik Özellikleri, Alemdaroğlu, K., Akçal, T., Buğra, D. (editörler), *Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları*, İstanbul: Türk Kolon ve Rektum Cerrahi Derneği, s.413-20.
- Ekbom, A. vd. (1990) Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study, *N Engl J Med*, 323: 1228-33.
- Escobedo, J.A., vd. (1991) cDNA cloning of a novel 85 kd protein that has SH2 domains and regulates binding of PI3-kinase to the PDGFb-receptor, *Cell*, 65, 75-82.
- Engelman, J.A., Cantley, J. L. (2006) The Evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism, *Nature Reviews Genetics*, 7, 606-619.
- Faivre, S., Kroemer, G., Raymond, E. (2006) Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents, *Nat Rev*, 5:671- 8.
- Fenoglio Preiser, C.M., Noffsinger, A.E., Stemmermann, G.N., Lantz, P.E., Listrom, M.B., Rilke, F.O. (1999) Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine, In: Gastrointestinal pathology an atlas and text, 2nd ed, Philadelphia: *Lippincott-Raven Publishers*, 909- 1068.
- Fokkema, I.F., vd. (2011) LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases, *Hum. Mutat.* 32, 557-563.
- Foukas, L.C., vd. (2006) Critical role for the p110a phosphoinositide- 3-OH kinase in growth and metabolic regulation, *Nature*, 441, 366-370.
- Fruman, D.A., Meyers, R.E., Cantley, L.C. (1998) Phosphoinositide kinases, *Annu. Rev. Biochem*, 481-507.
- Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Speizer, F.E., Willett, W.C. (1994) A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer, *N Engl J Med*, 331(25):1669-74.

- Gilbert, W., Maxam, A. (1973) The nucleotide sequence of the lac operator, *Proc Natl Acad Sci*, 70 (12); 3581-3584.
- Griffiths, A.M., Buller, H.B. (2000) Inflammatory Bowel Disease In: Walker, Durie, Hamilton (editörler), *Pediatric Gastrointestinal Disease 3rd edition*. Ontario: B.C. Decker Inc, 613- 52.
- Guo, X.N., Rajput, A., Rose, R., Hauser, J., Beko, A., vd. (2007) Mutant PIK3CAbearing colon cancer cells display increased metastasis in an orthotopic model, *Cancer Res*, 67: 5851–5858.
- Hamilton, S.R., Aaltonen, L.A. (editörler) 2000 Tumours of the colon and rectum, In: *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*, World Healty Organization of Classification of Tumours, Lyon: *IARC Press*, 104- 19.
- Hamilton, S.R., Bosman, F.T., Boffetta, P., vd. (2010) Carcinoma of The Colon Rectum, WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th edition, pages 132-173.
- Hamilton, S.R., Vogelstein, B., Kudo, S., Riboli, E., Nakamura, S., Hainaut, P., Rubio, C.A., Sobin, L.H., Fogt, F., Winawer, S.J., Goldgar, D.E., Jass, J.R. (2000) World health organisation classification of tumors, Pathology and genetics of tumors of the digestive system, Tumors of colon and rectum, *IARC Pres* 103-143.
- Hampel, H., Frankel, W.L., Martin, E., Arnold, M., Khanduja, K., Kuebler, P., vd. (2008) Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer, *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(35):5783–8.
- Hartmann, W., Küchler, J., Koch, A., vd. (2009) Activation of phosphatidylinositol-3 ϕ -kinase/Akt signaling is essential in hepatoblastoma survival, *Clin Cancer Res*, 15:4538–4545.
- Hawk, E.T., Limburg, P.J., Viner, J.L. (2002) Epidemiology and prevention of colorectal cancer, *Surg Clin North Am*, 82: 905-941.
- Hay, N. (2005) The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer, *Cancer Cell*, 8:179-3.

- Hemminki, K., Eng, C. (2004) Clinical genetic counselling for familial cancers requires reliable data on familial cancer risks and general action plans, *J Med Genet*, 41: 801-807.
- Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., Mills, G.B. (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery, *Nat Rev Drug Discov*, 4:988–1004.
- Herreros-Villanueva, M., Gomez-Manero, N., Muniz, P., Garcia-Giron, C., Coma del Corral, M.J. (2011) PIK3CA mutations in KRAS and BRAF wild type colorectal cancer patients. A study of Spanish population, *Mol Biol Rep*, 38: 1347–1351.
- Horn, S., Berghotz, U., Jücker, M., vd. (2008) Mutations in the catalytic subunit of class IA PI3K confer leukemogenic potential to hematopoietic cells, *Oncogene*, 27:4096–4106.
- Huang, C.H., Mandelker, D., Schmidt-Kittler, O., vd. (2007) The structure of a human p110a/p85a complex elucidates the effects of oncogenic PI3K alpha mutations, *Science*, 318:1744–1748.
- Ikenoue, T., Kanai, F., Hikiba, Y., Obata T., Tanaka, Y., Imamura, J., Ohta, M., Jazag, A., Guleng, B., Tateishi, K., Asaoka, Y., Matsumura, M., Kawabe, T., Omata, M. (2005) Functional Analysis of PIK3CA Gene Mutations in Human Colorectal Cancer, *Cancer Res*, 65, (11), 4562.
- Iwabuchi, H., Sakamoto, M., Sakunaga, H., Ma, Y.Y., Carcangiu, M.L., Pinkel, D., Yang-Feng, T.L., Gray, J.W. (1995) Genetic analysis of benign, low-grade, and high- grade ovarian tumors, *Cancer Res.*, 55 6172–6180.
- Jass, J.R. (2000) Diagnostic Histopathology of Tumours, Fletcher, C.D.M., Livingstone, C. (editörler), *Tumours of the Small and Large Intestines (Including the Anal Region)*, Vol 1: 369- 409.
- Jung, S.M., Yoon, Y.S., Lim, S.B., Yu, C.S., Kim, J.C. (2016) Clinicopathological features of familial adenomatous polyposis in Korean patients, *World J Gastroenterol* 7; 22(17): 4380-4388.
- Kang, S., Bader, A.G., Vogt, P.K. (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:802-7.

- Kang, S., Denley, A., Vanhaesebroeck, B., Vogt, P.K. (2006) Oncogenic transformation induced by the p110beta, gamma, and delta isoforms of class I phosphoinositide 3-kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1289–1294.
- Karaks, B., Bachman, K. E., Park, B. H. (2006) Mutation of the PIK3CA Oncogene in Human Cancers, *British Journal of Cancer*, 94, 455– 459.
- Kawazoe, A., Shitara, K., Fukuoka, S., Kuboki, Y., Bando, H., Okamoto, W., Kojima, T., Fuse, N., Yamanaka, T., Doi, T., Ohtsu, A., Yoshino, T. (2015) A retrospective observational study of clinicopathological features of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Japanese patients with metastatic colorectal cancer, *BMC Cancer*, 15:258, DOI 10.1186/s12885-015-1276-z.
- Kodner, I.J., Fry, R.D., Fleshman, J.W., Birnbaum, E.H., Read, T.E. (2004) Principles of Surgery, Geçim İ.E. (editör), *Cerrahinin İlkeleri*, 7th ed. Antıp, 1283-1394.
- Koelzer, V.H., Herrmann, P., Zlobec, I., Karamitopoulou, E., Lugli, A., Stein, U. (2015) Heterogeneity analysis of Metastasis Associated in Colon Cancer 1 (MACC1) for survival prognosis of colorectal cancer patients: a retrospective cohort study, *BMC Cancer*, 15:160, DOI 10.1186/s12885-015-1150-z.
- Kozaki, K., Imoto, I., Pimkhaokham, A., Hasegawa, S., Tsuda, H., Omura, K., vd. (2006) PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma, *Cancer Sci*, 97:1351-8.
- Kumar, A., Michell, F. (2010) Robbins Pathologic Basis of Disease, 8th edition , chapter 17 pages 817-825.
- Kumar, V., Robbins, S., Cotran, R. (Çeviri: U, Çevikbaş) (2000) Temel Patoloji, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 505-514.
- Kuşakçıoğlu, Ö. (2003) *Kolorektal kanser hastalıkları*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1- 27.
- Küpelioğlu, A.A. (2004) Kolorektal Kanserde Histopatoloji, Kolorektal Özel Sayısı, Türkiye Klinikleri, *Journal of Surgery*, 9:25-7.

- Lafreniere, R., Ketcham, A.S. (1985) Primary squamous carcinoma of the rectum, Report of a case and review of the literature, *Dis Colon Rectum*, 25:967-972.
- Lee, S.Y., Kim, M.J., Jin, G., vd. (2010) Somatic mutations in epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in non-small cell lung cancers, *J Thorac Oncol*, 5:1734–1740.
- Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., Hemminki, K. (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer, *N Engl J Med*, 343(2):78-85.
- Ligresti, G., Militello, L., Steelman, L.S., Cavallaro, A., Basile, F., Nicoletti, F., Stivala, F., McCubrey, J.A., Libra, M. (2009) PIK3CA mutations in human solid tumors: Role in sensitivity to various therapeutic approaches, *Cell Cycle*, 8:9, 1352-1358, DOI: 10.4161/cc.8.9.8255.
- Luo, J., Manning, B.D., Cantley, L.C. (2003) Targeting the PI3K Akt pathway in human cancer: rationale and promise, *Cancer Cell*, 4:257–62.
- Lynch, H. T., Boland, C.R., Gong, G., Shaw, T.G., Lynch, P.M., Fodde, R., Lynch, J.F., de la Chapelle, A. (2006) Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications, *Eur J Hum Genet*, 14(4): 390-402.
- Maxam, A.M., Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA, *Proc Natl Acad Sci*, 74 (2); 560-564.
- Miled, N., Yan, Y., Hon, W.C., Perisic, O., Zvelebil, M., vd. (2007) Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase Catalytic subunit, *Science*, 317: 239–242.
- Miyoshi, Y., Nagase, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., Aoki, T., Miki, Y., Mori, T., Nakamura, Y. (1992) Somatic mutations of the apc gene in colorectal tumors: Mutation cluster region in the apc gene, *Hum. Mol. Genet*, 1, 229–233.
- Nosho, K., Kawasaki, T., Ohnishi, M., Suemoto, Y., Kirkner, G.J., vd. (2008) PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations, *Neoplasia*, 10: 534–541.

- Oda, K., Stokoe, D., Taketani, Y., McCormick, F. (2005) High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma, *Cancer Res*, 65:10669-73.
- Ogino, S., Nosho, K., Kirkner, G.J., Shima, K., Irahara, N., Kure, S., Chan, A.T., Engelman, J.A., Kraft, P., Cantley, L.C., Giovannucci, E.L., Fuchs, C.S. (2009) PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer, *J Clin Oncol*, 1477-1484.
- Omata, M., Kawabe, T., Matsumura, M., Asaoka, Y., Tateishi, K., Guleng, B., Jazag, A., Ohta, M., Imamura, J., Tanaka, Y., Obata, T., Hikiba, Y., Kanai, F., Ikenoue, T. (2005) Functional Analysis of PIK3CA Gene Mutations in Human Colorectal Cancer, *Cancer Res*, 65(11): 4562-7.
- Orloff, M.S., He, X., Peterson, C., vd. (2013) Germline PIK3CA and AKT1 mutations in Cowden and Cowden-like syndromes, *Am J Hum Genet*, 92:76–80.
- Osaki, M., Oshimura, M., Ito, H. (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer, *Apoptosis*, 9:667–76.
- Öner, C. (2002) *Genetik Kavramlar*, Palme Yayıncılık, Ankara, 677s.
- Pang, B., Sun, S.P., Gao, L., Zhu, R.L., Zhang, L.X., An, C., Liu, Z.Y., Liu, G.J. (2014) A single nucleotide polymorphism in PIK3CA gene is inversely associated with P53 protein expression in breast cancer, *Med Oncol*, (7):30. doi: 10.1007/s12032-014-0030-8.
- Pedro, L.P., Efrain, B.C., Isabel, A., Antonio, M. vd. (2005) Prognostic significance of circumferential margin involvement in Rectal Adenocarcinoma Treated With preoperative Chemoradiotherapy and Low Anterior Resection, *Journal of Surgical Oncology*, 90: 20-25.
- Phillips, W.A., Russell, S.E., Ciavarella, M.L., Choong, D.Y., Montgomery, K.G., Smith, K., Pearson, R.B., Thomas, R.J., Campbell, I.G. (2006) Mutation analysis of PIK3CA and PIK3CB in esophageal cancer and Barrett's esophagus, *Int J Cancer*, 118:2644-2646.

- Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1992) Apc mutations occur early during colorectal tumorigenesis, *Nature*, 359, 235–237.
- Qiu, W., Schönleben, F., Li, X., Ho, D.J., Close, L.G., Manolidis S., vd. (2006) PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma, *Clin Cancer Res*, 12:1441-6.
- Rosai, J. (2004) Gastrointestinal tract. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, Volume 1., 9. Edition, *Mosby*, 776-855.
- Rosty, C., Young, J.P., Walsh, M.D., Clendenning, M., Sanderson, K., vd. (2013) PIK3CA Activating Mutation in Colorectal Carcinoma: Associations with Molecular Features and Survival, *PLoS ONE*, 8(6): e65479. doi:10.1371.
- Sanger, F., Coulson, A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *J Mol Biol*, 94 (3); 441-448.
- Samuels, Y., Diaz, L.A., Schmidt-Kittler, O., Cummins, J.M., Delong, L., vd. (2005) Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells, *Cancer Cell*, 7: 561–573.
- Samuels, Y., Ericson, K. (2006) Oncogenic PI3K and its role in cancer, *Curr Opin Oncol*, 18:77–82.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., vd. (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers, *Science*, 304:554.
- Scott, R.J., Masson, A.L., Bente, A., Palmer, T., Evans T.J., Elduff, P., Allan, D., Garry S., Hannan, N. (2016) Copy number variants associated with 18p11.32, DCC and the promoter 1B region of APC in colorectal polyposis patients, *Meta Gene*, 95–104.
- Shah, S., Shah, S., Padh, H., Kalia, K. (2015) Genetic alterations of the PIK3CA oncogene in human oral squamous cell carcinoma in an Indian population, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio*, 120(5):628-35.
- Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., vd. (1999) PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer, *Nat Genet*, 21: 99–102.

- Smith, J.A., Bhathal, P.S., Cuthbertson, A.M. (1990) Angiosarcoma of the colon, A report of a case with long-term survival, *Dis Colon Rectum*, 33:330-333.
- Sökmen, S. (2004) Kolorektal Kanserde Prognoz, Kolorektal Özel Sayısı, Türkiye Klinikleri, *Journal of Surgery*, 9:57-65.
- Stenson, P.D., vd. (2009) The Human Gene Mutation Database: 2008 update, *Genome Med*, 1, 13.
- Stoffel, E.M., Kastrinos, F. (2014) Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome, *Clin Gastroenterol Hepatol*, 12:1059–1068.
- Tahir, A.A., Sani, N.F.A., Murad, N.A., Makpol, S., Ngah, W.Z.W., Yusof, Y.A.M. (2015) Combined ginger extract & Gelam honey modulate Ras/ERK and PI3K/AKT pathway genes in colon cancer HT29 cells, *Nutrition Journal*, 14:31, DOI 10.1186/s12937-015-0015-2.
- Takayama, T., Miyamishi, K., Hayashi, T., Sato, Y., Nitsu, Y. (2006) Colorectal cancer: genetics of development and metastasis, *J Gastroenterol*, 41(3): 185-92.
- Topuz, E., Aykan, F.N. (1998) Sindirim Sistemi Kanseri, *İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları*, 373-475.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J., Waterfield, M.D. (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids, *Annu. Rev. Biochem*, 535–602.
- Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M.D. (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide3-kinases, *Exp Cell Res*, 253:239–54.
- Velho, S., Oliveira, C., Ferreira, A., Ferreira, A. C., Suriano, G., Schwartz, S., Duval, A., Carneiro, F., Machado, J. S., Hamelin, R., Seruca, R. (2005) The Prevalance of PIK3CA Mutations in Gastric and Colon Cancer, *European Journal of Cancer*, 41, 1649–1654.
- Vivanco, I., Sawyers, C.L. (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer, *Nat Rev Cancer*, 2:489–501.

- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., Bos, J.L. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development, *N Engl J Med*, 319(9): 525-32.
- Vogt, P., Kang, S., Elsliger, M. A., Gymnopoulos, M. (2007) Cancer – Specific Mutations in Phosphatidylinositol 3- Kinase, *Trends in Biochemical Sciences*, 32, (7), 343.
- Weinberg, R.A. (1996) How cancer arises, *Sci Am*, 275:62-70.
- Whyte, D.B., Holbeck, S.L. (2006) Correlation of PIK3Ca Mutations with Gene Expression and Drug Sensitivity in NCI-60 Cell Lines, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340, 469–475.
- Wysocki, P.J. (2009) mTOR in renal cell cancer: modulator of tumor biology and therapeutic target, *Expert Rev Mol Diagn*, 9: 231-41.
- Yamulla, R.J., Kane, E.G., Moody, A.E., Politi, K.A., Lock, N.E., Foley, A.V., Roberts, D.M. (2014) Testing models of the apc tumor suppressor/beta-catenin interaction reshapes our view of the destruction complex in Wnt signaling, *Genetics*, 197, 1285–1302.
- Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., vd. (1998) Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3V-kinase: stabilization and inhibition of the p110a catalytic subunit by the p85 regulatory subunit, *Mol Cell Biol*, 18:1379–87.
- Zhao, L., Vogt, P. K. (2008) Helical Domain and Kinase Domain Mutations in p110 of Phosphatidylinositol 3-kinase Induce Gain of Function by Different Mechanisms, *PNAS*, 105, (7), 2652–2657.
- Zhu, Y.F., Yu, B.H., Li, D.L., Ke, H.L., Guo, X.Z., Xiao, X.Y. (2012) PI3K expression and PIK3CA mutations are related to colorectal cancer metastases, *World J Gastroenterol*, 18(28): 3745-3751.

EKLER

PIK3CA (Phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate 3-kinase catalitic subunit alpha) Gen Sekansı (GenBank No: NM_006218)

TCTCCCTCGGCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGGGCTGGGACCCGATGCGGTTAGAGCCGC
GGAGCCTGGAAGAGCCCCGAGCGTTTCTGCTTTGGGACAACCATACATCTAATTCCTTAA
AGTAGTTTTATATGTAAACTTGCAAAGAATCAGAACAAATGCCTCCACGACCATCATCAG
GTGAACTGTGGGGCATCCACTTGATGCCCCAAGAATCCTAGTAGAATGTTTACTACCAA
ATGGAATGATAGTGACTTTAGAATGCCTCCGTGAGGCTACATTAATAACCATAAAGCATG
AACTATTTAAAGAAGCAAGAAAATACCCCTCCATCAACTTCTTCAAGATGAATCTTCTT
ACATTTTCGTAAGTGTTACTCAAGAAGCAGAAAGGGAAGAATTTTTTGATGAAACAAGA
CGACTTTGTGACCTTCGGCTTTTTCAACCTTTTTAAAGTAATTGAACCAGTAGGCAACC
GTGAAGAAAAGATCCTCAATCGAGAAATTTGGTTTTGCTATCGGCATGCCAGTGTGTGAAT
TTGATATGGTTAAAGATCCAGAAGTACAGGACTTCCGAAGAAATATTCTGAACGTTTGTA
AAGAAGCTGTGGATCTTAGGGACCTCAATTCACCTCATAGTAGAGCAATGTATGTCTATC
CTCCAAATGTAGAATCTTCACCAGAATTGCCAAAGCACATATATAATAAATTAGATAAAG
GGCAAATAATAGTGGTGATCTGGGTAATAGTTTCTCCAAATAATGACAAGCAGAAGTAT
ACTCTGAAAATCAACCATGACTGTGTACCAGAACAAGTAATTGCTGAAGCAATCAGGAA
AAAACTCGAAGTATGTTGCTATCCTCTGAACAATAAACTCTGTGTTTTAGAATATCA
GGGCAAGTATATTTTAAAAGTGTGTGGATGTGATGAATACTTCCTAGAAAAATATCCTCT
GAGTCAGTATAAGTATATAAGAAGCTGTATAATGCTTGGGAGGATGCCCAATTTGATGTT
GATGGCTAAAGAAAGCCTTTATTCTCAACTGCCAATGGACTGTTTTACAATGCCATCTTA
TTCCAGACGCATTTCCACAGCTACACCATATATGAATGGAGAAACATCTACAAAATCCCT
TTGGGTATAAATAGTGCACCTCAGAATAAAAAATTCTTTGTGCAACCTACGTGAATGTAAA
TATTCGAGACATTGATAAGATCTATGTTTGAACAGGTATCTACCATGGAGGAGAACCCTT
ATGTGACAATGTGAACACTCAAAGAGTACCTTGTTCCAATCCCAGGTGGAATGAATGGCT
GAATTATGATATATACATTCCTGATCTTCCTCGTGCTGCTCGACTTTGCCTTTCCATTTGCT
CTGTAAAGGCCGAAAGGGTGCTAAAGAGGAACACTGTCCATTGGCATGGGGAAATATA
AACTTGTTTGATTACACAGACACTCTAGTATCTGGAAAAATGGCTTTGAATCTTTGGCCA
GTACCTCATGGATTAGAAGATTTGCTGAACCCTATTGGTGTTACTGGATCAAATCCAAAT
AAAGAACTCCATGCTTAGAGTTGGAGTTTGACTGGTTCAGCAGTGTGGTAAAGTTCCCA
GATATGTCAGTGATTGAAGAGCATGCCAATTGGTCTGTATCCCGAGAAGCAGATTAGC
TATTTCCACGCGAGTGAAGTAAACAGACTAGTAGAGACAATGAATTAAGGGAAAATGA
CAAAGAACAGCTCAAAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCAGG
AGAAAGATTTTCTATGGAGTCACAGACACTATTGTGTAACATATCCCCGAAATTCTACCCA
AATTGCTTCTGTCTGTAAATGGAATTCTAGAGATGAAGTAGCCCAGATGTATTGCTTGG
TAAAAGATTGGCCTCCAATCAAACCTGAACAGGCTATGGAACCTTCTGGACTGTAATTACC
CAGATCCTATGGTTTCGAGGTTTTGCTGTTCGGTGCTTGGAAAAATATTTAACAGATGACA
AACTTTCTCAGTATTTAATTCAGCTAGTACAGGTCCTAAAATATGAACAATATTTGGATA
ACTTGCTTGTGAGATTTTTACTGAAGAAAGCATTGACTAATCAAAGGATTGGGCACTTTT
TCTTTTGGCATTTAAAATCTGAGATGCACAATAAAACAGTTAGCCAGAGGTTTGGCCTGC
TTTTGGAGTCCTATTGTCTGTCATGTGGGATGTATTTGAAGCACCTGAATAGGCAAGTCG
AGGCAATGGAAGGCTCATTAACCTTAACCTGACATTCTCAAACAGGAGAAGAAGGATGAA
ACACAAAAGGTACAGATGAAGTTTTAGTTGAGCAAATGAGGCGACCAGATTTTCATGGA
TGCTCTACAGGGCTTTCTGTCTCCTCTAAACCCTGCTCATCAACTAGGAAACCTCAGGCTT
GAAGAGTGTCGAATTATGTCCTCTGCAAAAAGGCCACTGTGGTTGAATTGGGAGAACCC
AGACATCATGTACAGATTACTGTTTCAAGAACAAATGAGATCATCTTTAAAAATGGGGATGA
TTTACGGCAAGATATGCTAACACTTCAAATTATTCGTATTATGGAATAATCTGGCAAAA
TCAAGGTCTTGATCTTCAATGTTACCTTATGGTTGTCTGTCAATCGGTGACTGTGTGGGA

CTTATTGAGGTGGTGCGAAATTCTCACACTATTATGCAAATTCAGTGCAAAGGCGGCTTG
 AAAGGTGCACTGCAGTTCAACAGCCACACACTACATCAGTGGCTCAAAGACAAGAACAA
 AGGAGAAATATATGATGCAGCCATTGACCTGTTTACACGTTTCATGTGCTGGATACTGTGT
 AGCTACCTTCATTTTGGGAATTGGAGATCGTCACAATAGTAACATCATGGTGAAAGACGA
 TGGACAACCTGTTTCATATAGATTTTGGACACTTTTTGGATCACAAGAAGAAAAAATTTGG
 TTATAAACGAGAACGTGTGCCATTTGTTTTGACACAGGATTTCTTAATAGTGATTAGTAA
 AGGAGCCCAAGAATGCACAAAGACAAGAGAATTTGAGAGGTTTCAGGAGATGTGTTACA
 AGGCTTATCTAGCTATTCGACAGCATGCCAATCTCTTCATAAATCTTTTCTCAATGATGCT
 TGGCTCTGGAATGCCAGAACTACAATCTTTTGATGACATTGCATACATTCGAAAGACCCT
 AGCCTTAGATAAACTGAGCAAGAGGCTTTGGAGTATTTTCATGAAACAAATGAATGATG
 CACATCATGGTGGCTGGACAACAAAAATGGATTGGATCTTCCACACAATTAACAGCAT
 GCATTGAACTGAAAAGATAACTGAGAAAATGAAAGCTCACTCTGGATTCCACACTGCAC
 TGTTAATAACTCTCAGCAGGCAAAGACCGATTGCATAGGAATTGCACAATCCATGAACA
 GCATTAGAATTTACAGCAAGAACAGAAATAAAATACTATATAATTTAAATAATGTAAAC
 GCAAACAGGGTTTGATAGCACTTAACTAGTTTCATTTCAAAATTAAGCTTTAGAATAATG
 CGCAATTTTCATGTTATGCCTTAAGTCCAAAAAGGTAAACTTTGAAGATTGTTTGTATCTTT
 TTTTAAAAAACAAAAACAAAAACAAAAATCCCCAAAAATATATAGAAATGATGGAGAAGGA
 AAAAGTGATGGTTTTTTTTGTCTTGCAAATGTTCTATGTTTGAAGTGTGGACACAACAA
 GGCTGTTATTGCATTAGGTGTAAGTAACTGGAGTTTATGTTAAATTACATTGATTGGAA
 AAGAATGAAAATTTCTTATTTTTCCATTGCTGTTCAATTTATAGTTTGAAGTGGGTTTTTG
 ACTGCTTGTTAATGAAGAAAAATGCTTGGGGTGGAAAGGGACTCTTGAGATTTCACCAGA
 GACTTTTTCTTTTTAATAAATCAAACCTTTTGATGATTTGAGGTTTTATCTGCAGTTTTGGA
 AGCAGTCACAAATGAGACCTGTTATAAGGTGGTATTTTTTTTTTTCTTCTGGACAGTATTT
 AAAGGATCTTATTCTTATTTCCCAGGGAAATTCTGGGCTCCCACAAAGTAAAAAAAAAAAA
 AAAATCATAGAAAAAGAATGAGCAGGAATAGTTCTTATTCCAGAATTGTACAGTATTCA
 CCTTAAGTTGATTTTTTTCTCCTTCTGCAATTGAACTGAATACATTTTTTCATGCATGTTTT
 CCAGAAAAATAGAAGTATTAATGTTATTAATAAAGATTATTTTTTTTATTAAGGCTATTTAT
 ATTATAGAACTATCATTAATATATATTCTTTATTTACATGATCTGTCCCATAGTCATGCA
 TTGTTTTGCACCCCAAATTTTTTATTGTTTCATAGCAGCATGGTCAGCTTTCTTCTTGATCTA
 TAGATGAGGCTCAGGCACTATCCCATTTATACCAATAACCAGTGTATAACTACTTAAGGA
 AAACATAAAAACTTCATCTTCTTCTTTTATTTCTTATGTGAATCTCCCGTCTTCCATTCT
 CTTTTATAATTGAGAATGTCTCAATCATATGAAATTAGTTACCAGAATTAACACAATTTA
 GACTATCTTCTGATTCCCTTAAACCCCTTTACTGAAGTATACTCATGAATAATACTTTAAA
 ATATGGGGGAATAGAAACCATGAACTTTTTACCTTTTTAACTATTTATCCATATCTCCAA
 AGTAGAACATTAAACCATTTTAAGATATGTCTCATTCCCAAGTAGTCAGAGCTCACTCTC
 CAACCTTTATTAATACTATTTGAGCACAGGACACATTCTTAACATTTTGAAAAACCTTA
 ACCCAAGATGTAGAGGCTACTGCTAGTCGTCATTCTAGAATCTGATATTTTACTCTGTATT
 TGAAATGAATGATTAATGTCCTAGGAAATTAGCTTTAGCAGATGTCCAGGTGCCACATCA
 AAAAAGTGCAATAATTATTGACAGTTTTTTAGATTAGGCATATTATTGGAAAACAACCTTT
 ATAAAGAGTGAACATTGTATACTCTAGTAAAACAGCATCACTTTAAAAATATTCATTTAT
 GAAATCTGTTACCTATAGTTGAAGTCTTGAGTAGTGAACAAGGGACTCTAATACCAATAC
 TCTTAATATCTGGCTATTTTAGATCCCTTAAAGGGCATAATTATTGGAAATTTAGGTATTT
 CACTAAAGCATGTATATAATATTGCCAACAAAGAAAAGTAAATTTGAAGATTAAGGGAAC
 TTAATTCTGCAAACTGTCTTGCGATAGTTAAGCAGAATTTAACTCTGTTTTAAGCAGGA
 AACCAGAAAGATTATTTTGCAGTTGTAGAAGATTTTCATACTTATTAACCTTATTAACA
 TTTTGTGTTGTTTAGATATAGGCAGTTGATACATACTAACATCCCAGCCTTTTCAATATCA
 GGGTTAAATTATAGGAAAACCTCAGTAAAATGGTACAAATCTGAAAGTTTGATGGTAGAA
 ACTGAAGATTTAACAGAGAACTGTGTTTTACCCGAGTGCCAAAAATGCTGTGAGCCTCCT
 TGCACAAAATTTATACCACTTTTGCATTTTTATCTATCAGTCCAGATAGTTGTCTCCCCTC
 CTTCTCCCAGGACCTCTCCACCATTAATAATGCACAAACCACATGGCCGATTTACCATTTT
 ACATTTATTTTCAAAAAGTTACTACAACCAAATTAATTCTATTAGAAGAAATGTAGACAAA
 TTCTATAAAGACTATAGATTGTGACCTAAGAAAGAAATGAGGCAAAGAACCAAACATTG
 AATTAATGCTACATGGGTGACTAAGATCTGTTTCAAGTCAGTGATAATATAGCCACTTC
 TGGGTACTTCAGTATCAGAGATCAGTTCTCGTGGTTTAGACAGTTCTCTATCTATAGCTGAC
 TATCCTTGTCCTTGAATATGGTGTAAGTACTGACTATTGGCTCTACAGTTTTATTGGGCCACTA
 AGAAATATTTCTTGAATAATTATTTTGAGAAAAAGTCTAAAAGTAATAAAAAATAATTTT
 AAACACACTGTAGTAAGAAATGACTGTTGGAAAATTATGCTTTCATTTCTACCATATTC

TCAGCTATACAAAACCATTTATTTTGAAGATTTTTAGACTACTGTTAATTTGAAATCTGTT
ACTCTTATTGTGGAATTTGTTTTTTAAAAAAGATGTTTCTAATTGGATTTTTAAAAAGAAG
AATGGAATTTGGTTGCTATTTTACAATAGAACCTAAGCTTTTTGTGGTTCTTAGTGTCCTA
TGTAAAACTTAGTGTCAAAGTAATCAACTTTGAGATTTTCCCTTCTATTCTGCTTTATATT
AAAAGCCCATTAGAAAAATGGGAACCTGGTGAATATATAATGAATTGTAAAATATTTTAAT
GTGTAACTTTTTCAACTGTGAACTGACTTGATTTTTTGGATGAAAACAGCTGCTGATAAA
GTATTTTGTGTAAAGTGTAGTTCTTATTAATCAGGAAAATGATGACTTGATTAGACTGTAT
ATGCCCTCTTGGATTTTATTTTAAATGGATTGGTGACTTTCACATAGGTAACACAGTCC
ATCTGTATTCTTTTTTCCATCAAAAATCGAGTGATTTGGAATTATAAAAAAATTGTGAGC
AGCCTATTTGAAAGGCATCATGGAAATTTACAGCACAATAACACGGATTTGTTTTTCT
TAATGATGTAAATCCGTTTAATTCATACTTTGATCAATAGCCCATGCTTGCCAACTCTGAA
GAAATTTAATTTCCAGCAGTATTTTAAAGCTAGCCTGTTAACTTTTTCTGAATATTTAAAG
TTCTCTTTTTCTATGTCTGCACAACTGCAGACCTGGGCTGGACCCACTCAAGAG
TCCACCTTAAGAAATTATTTTGATGTCCAAGACATCACTAAAATATTTAAGTTTAAAGAT
AATATGTGGTGTTAATAGATTGTGGTGCTTTTACTATTTAAAGACAACCTTTCATACTTCAG
ATGTTTTTGAGAAGAGGGGAATGTGAGGGGAGGGGGCAGAACAGGGAGGAGTTGTTTGA
ATGAATTACATTCTTTATATCCATCCTGCTCATTGGGGCATGTCTTTAAGAGAAGGCTGA
AAGTTGTGAGAGTATATTGTATACCGTAAGAGAATCAACTCTTCATCATGGATGGGATTG
TGAAGGCTGAACTATAAAATTCAGCATTGACAGCATCCTCAATTAATAATTCTTGGTGAC
AGAATAATACAGCTGGGCTGTTTTTAAATATAAACAATACCATTTTAAATTATTACATT
AAAAATTGTAAATATATCTATGTGCCATGGCCTGGGAAGCCTGCTTTCTTTTTTCATAAAA
ATTATTTTTACTGTATGAAAAGATCATGGGGTTTAGCTCAAAATATCTGTGGTCCTGATA
AAATTGGATTGGTAACTCTACCTCAGAAGGAAAATGGGAAAAAAAAAATAGATGAGTCAC
AATCAATACTTCAAGCTCAGAACTGTGCAGATCACTGAATTTTAGATTTATAAAGTCA
GAGTTGGCATGCCTTGTTTTAATGATATGGAAGACCTTAAGAAAAAACTTGGCTGAAG
TTTAATCGTTGGTCCAGCCATTTGAAAAAGGCAATAGTTTGAGGAGGTTCCCGAATTCGG
CATTTGAAATTCATTTTGTTCTCTCTTCTTCATTATTAGTGCATTTGGTGTGTGTATACTTG
CACACAATTCTGTTTGTGTACACACTGCTTGCTTAGCCCTAGTCAAGAGGCATCTTTTATA
AAAGGTGTAAAGAAATATCAAGGTTCTAAAATTCGGAAGAGTTTAGAATTTATTAGGAG
TTTCCCAAGTTGGGATGTTAGTCTTTAAATAAACTTCATGCACCTATTCCACTTAAGGTTT
TGCACCTCCTTTTTATTAGTGCAGTGCCATTTCTTCTGCTTGATTTTAGGTATGTTAATATT
CCAGCCTTGCTAGTTAGCATAAAGTGACAGGTGTGAGCCATGAGGAAATTTTCTGACTTA
ATTTGTACACAACACTACATATAAGAGTTTTAGTGGAGGAAAAAAATTAGTCCCTTGTGCGT
ATACAGTAGTTAGGTAAATGATTTTTCTACCAACAGTATACTCCATTCTCATGTAGGTA
AGTACAGAAAAAGGTTTTTAAATGTATTTTTTAGCCAGTTAAAGTCTATGAATCTATCTGC
AACCTTATTTAATCTGTCACTATAATAATTTTGTGGTTATGCTAAGAACCATGTATACTTT
TAGGTATTCTTATTTTGTCAATTTTTCTAGGTTGGCAAGGAGGCAGAAAACCTTCATTGT
TTCATATTAATAATATAATTAGACTAAACTTAATTCTAGTATGAATTTCCAAAATCATTATC
TATTTATTTTCATTTTTATTTAATTTTGTTTTTATTTTCATTTTTAAAAAGTCCCTTGTTCAATTT
AACTTATGTTCTAAGAGAGGTTGGAGAACTTGGCCTTCATCTGATTTCAAAAATGTTTT
GAGTTTCAAATGAAGTTAATGGTTTCAGTGTGATTGAGTCTCAGACCTAATTGGGTTGA
ATAAAATCTAAAAGAATATACCCTTTTGGAGCATAACATTTTAATACCTTGGGGAATGTG
GCACTACCAAAAAGAAGACTACTAACACGTCAGATGTTACCTGGAAGCTTTATCAAGAA
ATTCGAACCAACCTTTTGGCCCCATTAATTGTAGCAAGTTTATTTCTCTATATTTTGTCAAT
CAGTGAATTGAAGTCTGTGGTATACTGCATTCATTAGAAGAAAAACGTTTTTAATGTCC
TTTTAATGATGGCCAGAAAGCATTTGACACAGCAAGATGCATGTGTTACTATATTGAGA
ATATAGAATAATAACAGTATCACTAAATTTAAGACCTCTCCAGTCTTGCTGTTTCTAGC
AAGAAGTTTGGCCTGTGACTGCACTTACTGTTTATGCTCATCAGAACTGTCAATGTCTG
CTTTTCTTTAACTCTGCAGTCTGTAACATCACGCTGTTTATTAAGAAAAAAGAAAAAT
TAAAAAAGAAAAA

Etik Kurul Raporu

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR VE YAYIN ETİĞİ KURULU DEĞERLENDİRME FORMU

SAĞLIK BİLİMLERİ ETİK KURULU	
Protokol No:154	Karar No: 138
Araştırmanın Yürütücüsü	MSKÜ Fen Fakültesi öğrenci Taner KAYNAR
Araştırmanın Başlığı:	Muğla Bölgesindeki Kolorektal Kansere Hastalarında PIK3CA Genindeki Bazı Bölgelerin Mutasyon Analizi
Başvuru Formunun Etik Kurula Geldiği Tarih:	20.10.2015
Başvuru Formunun Etik Kurulda İncelendiği Tarih:	22.10.2015
Karar Tarihi:	22.10.2015

SONUÇ

1.	☒ Kabul. Araştırmanın/Projenin uygulanabilirliği konusunda bilimsel araştırmalar etiği açısından bir sakınca yoktur.
2.	☐ Düzeltme gereklidir.
3.	☐ Red.

Prof. Dr. Yasemin BALCI
(Başkan)

Prof. Dr. Nuzan TUĞAY

Prof. Dr. Erşan KARABABA

Prof. Dr. Feri ÖZTÜRK

Prof. Dr. Mümtaz NAZİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Taner Kaynar
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Zonguldak 25.08.1991
Medeni Hali : Bekar
Telefon : 05399218967
E-posta : tanerkaynar67@gmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	İstanbul Ataşehir Mehmet Rauf Lisesi	2010
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2014
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2016

Bilimsel Faaliyetler

1. Determination of Genetic Relationship of some Orobanche species collected from different locations in Muğla province – 2nd International Symposium on EuroAsian Biodiversity, SEAB 2016
2. Muğla Bölgesindeki Kolorektal Kanser Hastalarında PIK3CA Genindeki Bazı Bölgelerin Mutasyon Analizi - Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Araştırma Sempozyumu, FEBE 2016