

164241

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

**KOLOREKTAL KANSERLERİN PRİMER TÜMÖR VE
METASTAZLARINDAKİ GENOMİK KOPYA DEĞİŞİMLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BEHİYE KAYTAZ

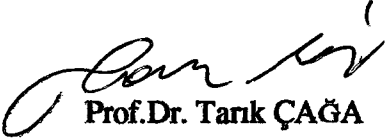
**DANIŞMAN
PROF.DR. SEVİLHAN ARTAN**

EYLÜL, 2005

KABUL VE ONAY SAYFASI

Behiye KAYTAZ'ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı “**Kolorektal Kanselerde Primer Tümör ile Metastazlarındaki Genomik Kopya Değişimleri**” başlıklı bu çalışma, jürimiz Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

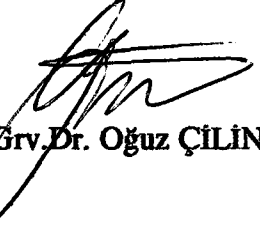
29/09/2005


Prof.Dr. Tarık ÇAĞA
ÜYE


Prof.Dr. Sevilhan ARTAN
ÜYE


Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR
ÜYE


Yrd.Doç.Dr. M. Namza MÜSLÜMANOĞLU
ÜYE


Öğr.Grv.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR
ÜYE

Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **13.10.2005** gün ve **651/1952**.. sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof.Dr. Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince akademik alandaki her türlü konuda değerli bilgilerini esirgemeyip, deneyimleriyle bana yardımcı olan, kimi zaman sorunlarımı paylaşıp bana yol gösteren ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum ve duymaya devam edeceğim çok değerli hocam **Sayın Prof. Dr. Sevilhan ARTAN'a**;

Benim hem lisansüstü eğitimimdeki eşsiz katkılarından hem de hayattaki hedeflerimi belirlememdeki büyük etkilerinden dolayı hocalarım; **Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR**, **Yrd.Doç.Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU**, **Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK** ve **Öğr.Grv.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR'e**;

Bana her zaman yanımda olduklarını hissettiren, sevgilerini ve dostluklarını benimle paylaşan tüm **GENTAM** çalışanlarına;

Tezimde çalıştığım materyallerin sağlanmasındaki katkı ve yardımlarından dolayı **Uzm. Dr. Nilgün ÖZDEMİR'e**

Tanıdığım günden beri hayatımda çok önemli yerlerde olan, bana her konuda olduğu gibi bu tez süresince de desteklerini esirgemeyen, sevdiğimde de üzüldüğümde de hep yanımda olan **Selma DEMİR**; **Koray ŞENEL** ve **PENTA** grubuna;

Ve tabi ki sadece bu tez süresince değil hayatım boyunca hep yanımda olan, bana olan inançlarını hiçbir zaman kaybetmeyip beni her zaman destekleyen ve cesaretlendiren, ne yapsam da onlara hep borçlu kalacağım değerli **aileme**;

Teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	v
SUMMARY	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kanser.....	4
2.1.1 Kanser Nedir?.....	4
2.1.2. Karsinogenezis süreci.....	5
2.2. Tümör Hücresinin Özellikleri.....	7
2.3. Kanser Genetik Bir Hastalık mıdır?.....	8
2.4. Kanserin Genetik Yapısı.....	10
2.4.1. Protoonkogen-Onkogen Değişimi.....	11
2.4.2. Tümör Süpresör Genler.....	14
2.4.3. DNA Tamir Genleri.....	16
2.5. Kolorektal Kanserler.....	17

2.5.1. Kolon ve Rektum.....	17
2.5.2. Kolorektal Kanser Etiyolojisi	20
2.6. Kolorektal Kanser ve Genetik.....	21
2.6.1. Familial adenomatöz polipozis koli (FAP).....	22
2.6.2. Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser (HNPCC).....	24
2.7. Kolorektal kanserlerdeki genomik instabilite.....	25
2.8. Kolorektal kanser metastazları.....	26
2.9. Kolorektal Lezyonlar.....	28
2.9.1. Neoplastik Olmayan Polipler.....	28
2.9.2. Neoplastik Polipler.....	28
2.10. Adenoma-Karsinoma Dizisi.....	29
2.10.1. APC tümör baskılayıcı genin kaybı.....	31
2.10.2. K- ras başkalaşımı.....	31
2.10.3. 18q21delesyon.....	32
2.10.4. TP53 kaybı.....	32
2.11. Kolorektal kanserlerde karşılaşılan Kromozom Anomalileri.....	33
2.12. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon.....	35
2.12.1. Yöntemin Avantajları.....	36
2.12.2. Yöntemin Dezavantajları.....	37
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	40
3.1. Gereç	40
3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri	40
3.1.2. Kullanılan Araçlar	41

3.1.2.1. Kullanılan Aygıtlar.....	41
3.1.2.2. Cam Malzeme	42
3.1.3. Kimyasal Maddeler	42
3.2. Yöntem....	45
3.2.1. Test DNA İzolasyonu.....	46
3.2.2. Referans DNA İzolasyonu.....	48
3.2.3. Test ve Referans DNA'ların Amplifiye Edilmesi.....	49
3.2.3.1. DOP Yöntemi.....	49
3.2.4. Test ve Referans DNA'ların floresan moleküllerle işaretlenmesi...	51
3.2.4.1. Nick Translasyon İşaretleme Yöntemi.....	51
3.2.4.1.1. DNase ile Kesim.....	52
3.2.4.1.2. Nick Translasyon Reaksiyonunun Durdurulması..	53
3.2.4.2. PCR İşaretleme.....	53
3.2.4.2.1. PCR işaretleme Reaksiyonunun Durdurulması.....	54
3.2.5. Presipitasyon.....	54
3.2.6. İşaretli DNA'nın Prob Haline Getirilmesi.....	55
3.2.7. Prob Denatürasyonu.....	56
3.2.8. Preparatların Hazırlanması ve Denatürasyonu.....	56
3.2.8.1. Metafaz Preparatlarının Hazırlanması.....	56
3.2.8.1.1. Preparatların Ön Yıkaması.....	56
3.2.9. İki Renkli FISH.....	57
3.2.10. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar.....	58
3.2.11. Preparatların DAPI ile Boyanması.....	58

3.2.12. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi ve Değerlendirilmesi.....	59
3.3. Kullanılan Stok Solüsyonlar.....	59
4. BULGULAR.....	65
4.1. Yönteme İlişkin Bulgular.....	67
4.2. Tümör örneklerine İlişkin Bulgular.....	71
4.2.1. Primer Tümördeki Anomaliler.....	71
4.2.2. Metastaz Örneklerindeki Anomaliler.....	73
5. TARTIŞMA.....	88
6. SONUÇ.....	97
7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	100
ÖZGEÇMİŞ.....	112

ÖZET

Kolorektal kanser dünyada kanser orjinli ölümlerin en önemli nedenlerinden biridir. Metastazların, kanser nedenli ölümlerin büyük bölümünden sorumlu olmasına rağmen kolorektal kanser metastazların moleküler yapıları henüz çok az çalışılmıştır. Bu çalışma primer tümörler ile metastazlardaki genomik anomalileri belirlemek ve böylece metastatik yayılıma yatkınlığa neden olabilecek genetik olayları ortaya koyabilecek primer tümörler ile metastatik tümörler arasındaki genetik farklılıklar saptanabilecektir. Çalışmada, 25 primer tümör, 4 karaciğer ve bir over metastazı ile 8 lenf nodu tümörü olmak üzere toplam 38 tümör örneği yüksek rezolusyonlu-karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (YR-KGH) tekniği ile analiz edilmiştir. Bu yöntemde, parafinize tümör örnekleri ile sağlıklı erkekten alınan periferik kan örneğinden DNA izolasyonu (sırasıyla test DNA ve kontrol DNA) yapılmış olup test ve kontrol DNA örnekleri dejenere oligonükleotid primer- polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmış, test DNA Spectrum Green, kontrol DNA ise Spectrum Red ile işaretlenmiştir. Daha sonra işaretli DNA'lar normal lenfosit metafaz preparatında hibridize edilmişlerdir. YR-KGH profilleri analiz edilerek gruplardaki genomik kopya aberasyonları karşılaştırılmıştır. Bulgular, genomik kopya aberasyon frekansının dokudaki hücresel farklılaşma azaldıkça arttığını göstermiştir. Kromozom 8q, 13q, 20q artışları ile kromozom 8p, 17p ve 18q delesyonları sıklıkla gözlenen anomalilerdi. Kromozom 2p, 7p12, ve 7p21 artışları ilk olarak bu çalışmada primer tümörlerde gözlenen anomalilerdi. Kromozom 4q, 10q, 14q ve 20p artışları sadece primer tümörlerde gözlenen anomalilerdi. Diğer taraftan genomik kopya aberasyon sıklığının karaciğer metastazlarında daha yüksek olduğu saptandı. Kromozom 9q ve 12p artışları sadece karaciğer metastazlarında gözlenen anomaliler iken kromozom 10p artışı sadece lenf nodu tümörlerinde gözlemlendi.

Tümörlerde yeni aday kromozomal bölgelerin saptanması ve daha önce rapor edilen anomalilerin çalışmamızda daha yüksek sıklıkta gözlenmesinin kullanılan teknikten kaynaklandığı düşüncesindeyiz. Çünkü YR-KGH'nin rezolusyon gücü (>3-4 Mb) klasik KGH rezolusyon gücüne (>5-10 Mb) göre daha yüksektir. Bilgilerimize

göre bu çalışma kolorektal tümörler ile metastazların YR-KGH tekniği ile incelendiği ilk çalışmadır. Çalışma bulguları, tümörün yayılımındaki farklılığın metastatik fenotipe ait özelliklerden sorumlu spesifik değişimlerin gözlemlendiği rastgele olmayan kromozom anomalilerinin birikimden kaynaklanabileceğini gösterir niteliktedir. Ancak çalışma popülasyonunun genişletilmesi ve ileri analizlerde elde edilen verilerin hastalık prognozu ile bağlantısının kurulmasının klinikte büyük faydalar sağlayacağı düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler:YR-KGH, kolorektal karsinom, metastazlar, genomik kopya değişimleri

SUMMARY

Colorectal cancer is one of the most common causes of cancer-related death in the world. Although metastasis is responsible for most cancer deaths, molecular basis of colorectal cancer metastasis remains poorly studied. This study was undertaken to identify genomic imbalances specific to primary tumors and metastatic tissues and so assess genetic differences between primary and metastatic tumors that might identify genetic events predisposing to metastatic dissemination. In total, 38 tumor specimens, including 25 primary tumors, 4 liver an done over metastasis and 8 lymph node tumors, were analyzed by the High Resolution- Comparative Genomic Hybridization (HR-CGH) technique. In this method, DNAs from paraffin embedded tumor tissues (test DNA) and from peripheral blood of a healthy man (control DNA) were amplified by degenerated-oligonucleotide primed-polymerase chain reaction (DOP-PCR) and labeled with spectrum gren and spectrum red, respectively. Then the labeled DNAs were applied onto normal lymphocyte metaphase preperations in hybridization. The HR-CGH profiles were analyzed and the genomic copy aberrations were compared in the groups. The results showed that the frequency of genomic copy aberrations were increasing in the tumors with poor cellular differentiation. Overrepresentations were detected most frequently at 8q, 13q,20q and deletions were prominent at 8p, 17p and 18q. Chromosome 2p, 7p12 and 7p21gains were newly diagnosed aberrations in the primary tumors. Gains on chromosomes 4q, 10q, 14q ve 20p were only seen in the primary tumors. On the other hand, the frequency of genomic copy aberrations were higher in the liver metastasis than the primary tumors. The gains on 9q and 12p were specific aberrations in liver metastasis whereas 10p gains were seen in only lymph node tumors.

We concluded that detection of new putative chromosomal regions in the tumors and higher frequencies in previously reported non-random genomic copy aberrations resulted from the used technique, HR-CGH whose resolution ability (>3-4 Mb) is higher than the resolution capacity of KGH (>5-10 Mb). Depending on our knowledge, this is the first study for HR-CGH analysis in colorectal tumors and metastasis. The analysis

suggested that the different pathways of tumor dissemination are reflected by a nonrandom accumulation of chromosomal alterations with specific changes being responsible for the different characteristics of the metastatic phenotype. However, further analysis in larger populations are necessary and combinations of these evidences with disease prognosis might be very helpful in clinics.

Key words: HR-CGH, colorectal carcinoma, metastases, genomic copy changes



SEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Karsinojenezis sürecinin temel bir şeması	5
Şekil 2.2. Kontak inhibisyon	7
Şekil 2.3. Erb-B onkogeninin aktivasyon mekanizması	12
Şekil 2.4. Kolonun anatomik yapısı	18
Şekil 2.5. Beta kateninlerin fonksiyon ve stabilitesinin regülasyonunda APC'nin rolü.	23
Şekil 2.6. Metastatik olaylar zinciri	27
Şekil 2.7. Adenoma-Karsinoma dizisi	29
Şekil 2.8. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon şekli	38

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1.: Uygun Fragment uzunluğu	68
Resim 4.2.: Sol tarafta 700kb'dan büyük fragment uzunluğu Sağ tarafta 200kb'dan düşük fragment uzunluğu	69
Resim 4.3. PCR işaretleme sonrası farklı fragment boyutları	69
Resim 4.4.: Farklı boyutlardaki PCR İşaretlemenin kesim sonrasındaki görüntüsü	70
Resim 4.5.: 1. olguya ait Metafaz Prob görüntüsü	80
Resim 4.6.: Kontrole ait KGH analiz görüntüsü	81
Resim 4.7.: 4. olgunun primer tümörüne ait KGH analiz görüntüsü	82
Resim 4.8.: Primer tümörlere ait profil görüntüsü	83
Resim 4.9.: 2. olgunun karaciğer metastazına ait KGH analiz görüntüsü	84
Resim 4.10.: Karaciğer metastazlarına ait profil görüntüsü	85
Resim 4.11.: 1. olgunun lenf nodu metastazına ait KGH analiz görüntüsü	86
Resim 4.12.: Lenf nodu metastazlarına ait profil görüntüsü	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1.: Erkeklerde en çok görülen on kanser türü	19
Çizelge 2.2.: Kadınlarda en çok görülen on kanser türü	19
Çizelge 4.1.: Çalışma hastalarının yaş,cinsiyet, histopatolojik aşama, tümör bölgesi, tümör çeşidi ve astler-coller aşamasına göre özellikleri.	66
Çizelge 4.2.: Çalışmaya dahil olan örneklerde gözlenen genomik kopya değişimleri	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	Deoksiribonükleikasit
KGH	Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
FISH	Floresan İn Situ Hibridizasyon
M-FISH	Multipleks Floresan İn Situ Hibridizasyon
GTP	Güanozin tri fosfat
EGF	Epidermal Growth Factor
erbB	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog
H-ras	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
GDP	Güanozin di fosfat
Gly	Glisin amino asiti
N-myc	v-myc myelocytomatosis viral related
IgH	İmmünoglobulin H
C-myc	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
abl	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
bcr	Breakpoint cluster region
Rb	Retinoblastom
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
TP53	Tumor protein p53
P53	Tumor suppressor p53
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
KRK	Kolorektal kanser
FAP	Familial adenomatous polypozis
APC	Adenomatous Polypozis Coli
HNPCC	Hereditary Non-Polypozis Colorectal Carcinoma
WNT	Wingless-type MMTV integration site family

TCF	T-cell factor
DNA-MMR	Deoxyribonucleic acid Mismatch repair
hMLH1	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2
hMSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1
PMS1	PMS1 postmeiotic segregation increased 1
PMS2	PMS2 postmeiotic segregation increased 2
PCR	Polymerase Chain Reaction
MSI	Microsatellite Instability
CIN	Chromosomal Instability
K-Ras	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
DCC	Deleted in colon carcinoma
MADH2/SMAD2	mothers against DPP homolog 2
MADH4	mothers against DPP homolog 4
DPC4/SMAD4	Deleted in Pancreatic carcinoma
TGF- β	Transforming growth factor β
BAX	BCL2-associated X protein
DRA	Downregulated in adenoma
Hsr	Homogeneous stain region
PRL-3	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3
Mb	Mega base
FITC	Fluorescein isothiocyanate
CCD	Cooled Charged Camera
HCL	Hidrochlorik asit
KCL	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mM	Milimolar
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
DOP-PCR	Degenerate Oligonucleotide Primer- Polymerase Chain Reaction
SSC	Sodyum Sitrat Salin

PBS	Phosphate Buffered Saline
μ l	Mikrolitre
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
YR-KGH	Yüksek rezolüsyonlu karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
TAE	Tris asetik asit EDTA
NaCl	Sodyum klorür
kb	kilo baz
Kc	Karaciğer
ZNF217	Zinc finger protein 217
CYP24	Cytochrome P450, family 24, subfamily A,
NCOA3	Nuclear receptor coactivator 3
REL	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
MYCNOS	v-myc myelocytomatosis viral related
THBR	Thyroid hormone receptor, beta
CSFR1	Colony stimulating factor 1 receptor
WNT7A	Wingless-type MMTV integration site family, member 7A
USP4	Ubiquitin specific peptidase 4

1.GİRİŞ ve AMAC

Kolorektal kanserler gastrointestinal sistemde en sık görülen kanserler olup, batı ülkelerinde morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerinden biridir[43,107]. Ülkemizde kolorektal kanserlerin insidansına ilişkin kesin veriler bulunmamakla birlikte Sağlık Bakanlığı'nın yaptığı 2000 yılı istatistiklerine göre, kolorektal kanser sıklığı tüm kanserler içerisinde erkeklerde sekiz, kadınlarda beşinci sırada yer almaktadır. Ölüm nedenleri arasında da aynı sırayı korumaktadır[56,100].

Bugünkü bilgilerimiz, kanserin genetik orjinli bir hastalık olduğunu destekler niteliktedir.KontROLSÜZ hücre çoğalması ile karakterize olan kanserde, hücre bölünmesini, hücre ölümünü ve hücre farklılaşmasını kontrol eden genlerdeki başkalaşım (mutasyon) kanser oluşumu ve gelişiminden sorumludur[18,35,90].

Tümörlerin klonal yapısı, karsinogenezisin temel özelliğidir.Tek bir hücrede oluşan bir başkalaşım, o hücreye seçici bir çoğalma, gelişme avantajı sağladığı takdirde, o hücreden oluşan yavru hücrelerde de aynı başkalaşım bulunmaktadır. Böylece aynı başkalaşıma sahip bir hücre grubu oluşmaktadır. Bu grup içerisinde yer alan bir hücrede ikinci bir başkalaşımın olması yine hücrede ek bir çoğalma, gelişme avantajı sağlamakta olup bu hücrelerin sayısının artması ve başka bir hücre tipi haline gelmesine yol açmaktadır. Bu klonal yayılma devam eden sikluslarda da kendini göstermekte ve malign tümör gelişimine önderlik etmektedir. Görüldüğü üzere kanser oluşumu, çok aşamalı bir süreci gerektirmektedir[1,18,35,77,90].

Kolorektal kanserler, kanser gelişiminin çok aşamalı bir süreç olduğunun ilk olarak gösterildiği kanser grubudur.1990'lı yıllarda Fearon ve Vogelstein tarafından ortaya atılan modelde, adenom-karsinom sürecinde çeşitli genetik ve epigenetik değişimlerin rol oynadığı ifade edilmiş ve çok aşamalı süreç bugüne kadar yapılan çalışmalarda da doğrulanmıştır. Çeşitli intrinsik ve ekstrinsik faktörlerden etkilenen

genlerde oluşan başkalaşımlar, adenom-karsinom sũrecinin oluşmasına neden olmaktadır[27,32,41,43].

Genetik instabilite, kromozom ya da genlerdeki sayısal/yapısal hatayı ifade eder ve karsinogenezisdeki etkisi anlamlıdır. Son yıllarda kolorektal karsinomlarda genetik instabilitenin iki ana formu tanımlanmıştır: DNA yanlış-eşleşme onarımındaki bozukluklarla oluşan mikrosatellit instabilitesi ve genetik materyal kayıp ve artışlarıyla karakterize kromozomal instabilitedir[43,79]. Kolorektal kanserlerin yaklaşık %13 kadarında mikrosatellit instabilitesi, geri kalan %87 kadarında ise kromozom instabilitesi rapor edilmiştir[43,81].

Kromozom instabilitesinde telomer disfonksiyonu, DNA tamir mekanizmalarındaki hatalar ve kromozom segregasyon hataları rol oynamaktadır[2]. Kromozomal instabilite tiplerinin belirlenmesinin, kolorektal karsinom prognozu ve progresyonu hakkında önemli ipuçları sağlayacağı, hastalığın tedavisinde anlamlılık gũsteren belirleyicilerin (markerların) bulunmasına yardımcı olabileceği ifade edilmektedir[43].

Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (KGH), bir molekũler sitogenetik yũntem olup genomdaki dengesiz genomik kopya artış ya da eksilmeleri tek bir hibridizasyon ile gũstermektedir[43]. İncelenecek genoma ilişkin DNA ile kontrol DNA'sının iki farklı tanımlayıcı (prob) olarak kullanılması ve normal metafaz kromozomları ũzerinde molekũler hibridleşmeye dayanan bir yũntemdir. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon 1990'lı yıllarda klinik sitogenetik, kanser genetiği ve preimplantasyon genetik tanıda yaygın olarak kullanılan bir yũntem haline gelmiştir[16].

İncelenecek genoma ilişkin DNA materyalinden yararlanılması, kromozom elde etme zorunluluğu olmaması nedeniyle klasik sitogenetik ile diğer molekũler sitogenetik (FISH, M-FISH) yũntemlere gũre avantajlıdır. Ayrıca tek bir hibridizasyon ile tũm genom hakkında bilgi sahibi olunması da bu yũntemin diğer bir ũstũnlũęüdür.

Yukarıda ifade edilen avantajları nedeniyle KGH, özellikle kanser genetiğinde tekrarlayan genomik kopya aberasyonlarının belirlenmesinde çok yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir ki kolorektal kanserler de bu grup içerisinde yer almaktadır[43,87] ve kromozom 7, 8q, 13q ve 20q'daki genomik kopya artışları ile kromozom 4, 8p, 14, 17p ve 18q'daki delesyonlar primer tümörlerdeki KGH çalışmalarında sıklıkla tekrarlayan anomaliler olarak bildirilmektedir [3,26,27,43,75,76,97].

Bilindiği üzere metastaz pek çok kanser nedeni ölümünden sorumludur. Lokal olarak gelişen bir tümörden metastatik, öldürücü bir tümör haline geçişiyle oluşan kanser progresyonunda, tümörün metastaz aşamasına gelmesi önemli bir basamaktır. Tümör hücrelerinde, metastaz için gerekli kompleks olaylar zincirinin tamamlanmasına izin veren çok sayıdaki değişimi tetikleyen faktör ya da faktörlerin olması gerekir. Bu olaylarda etkisi olduğu düşünülen oldukça az sayıda gen tanımlanmıştır. Ancak tetikleyen kromozom ya da gen aberasyonlarının belirlenmesi, metastaz gelişiminin önlenmesinde etkili olabilecek terapötik stratejilerin saptanmasında dolayısıyla da kanser mortalitesinin azaltılmasında etkili olacaktır. Bu terapilerin geliştirilmesi kuşkusuz metastatik prosesin biyolojisini ve moleküler olaylarını daha iyi anlaşılmasını gerektirir[76].

Çalışmamızda, primer kolorektal kanser örnekleri ile kolon karsinoma metastaz örneklerinin KGH yöntemi ile genomik kopya aberasyonları açısından incelenerek sadece primer kolorektal kanser gelişimindeki moleküler mekanizmalar değil aynı zamanda kolon karsinom metastaz prosesindeki mekanizmaların da ortaya konması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

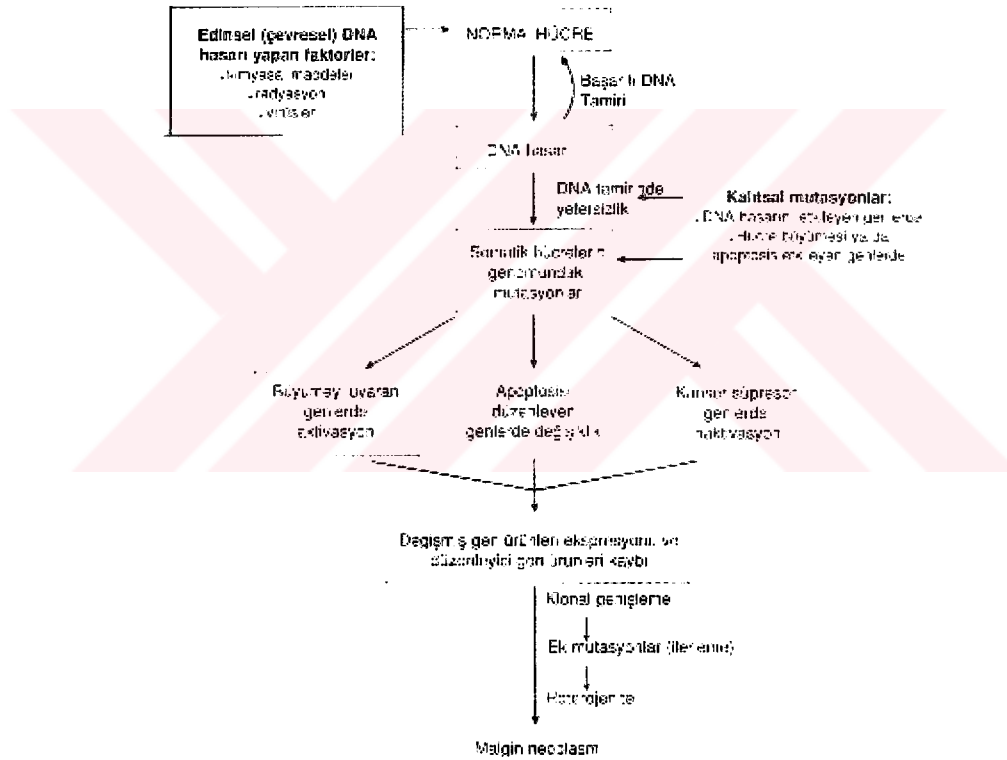
Kanser klinik tıbbın en yaygın ve en ciddi problemlerinden biridir. Yapılan istatistiksel çalışmalar kanserin, populasyonun 1/3 ünden fazlasında görüldüğünü, ölümlerin %20 kadarından sorumlu olduğunu ve gelişmiş ülkelerdeki toplam tıbbi bakım harcamalarının %10 kadarını kanser tedavi harcamalarının oluşturduğunu göstermiştir[90].

2.1.1. Kanser Nedir?

Kanser, tek bir hastalık olmayıp kitle ya da tümör oluşumuna yol açan kontrolsüz hücre çoğalmasıyla karakterize olan neoplazinin kesin formlarını tanımlamak için kullanılır. Malign bir neoplazi, kontrolsüz hücre proliferasyonu, komşu dokuları istila edebilme ve daha uzak bölgelere metastaz yapabilme yeteneği gibi çeşitli fenotipik özelliklere sahiptir[36,77,90]. Bu özellikler aşamalı bir şekilde kazanılır ve olay tümör evolusyonu olarak isimlendirilir[77]. Anormal hücre birikimi olan neoplazi, hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasındaki dengesizlik nedeniyle oluşur. Her hücre, hücre siklusuna girer ve mitozu uğrayarak yavru hücrelerini oluşturur. Normal koşullarda her hücrenin bir yaşam süresi vardır. Hücre gelişimi, yaşlanması ve ölümü belirli bir program dahilinde gerçekleşir ve her aşama farklı gen ürünleri ile düzenlenir. Bir dokuda çoğalan hücre ile ölen hücre oranında bir denge söz konusudur. Ancak hücrenin normalin dışında çoğalması, buna karşılık programlı hücre ölümü olarak ifade edilen apoptozis mekanizmasının görevini yerine getirmemesi, hücre çoğalması ile ölümü arasındaki dengenin bozulmasına ve dolayısıyla da hücre birikimine neden olur. Tüm bu mekanizmalar, gen ürünleri olan proteinler tarafından düzenlendiğinden, bir gendeki başkalaşım o genin kodladığı protein yada polipeptidin üretilmemesi, yanlış üretilmesi ya da normalden az üretilmesi ile sonuçlanır. Bunun sonucunda da ilgili proteinlerin rol aldığı mekanizmalarda normalden sapmalar ortaya çıkar[1,35,77,90].

2.1.2. Karsinogenezis Süreci

Karsinogenezis çok aşamalı bir süreçtir (Şekil 2.1). Kansere yol açan ajana (karsinojen) maruz kalınması hemen tümör gelişimine neden olmaz. Karsinojen tarafından başlatılan ilk başlangıç aşamasını takip eden olaylar zinciri sonucunda bir tümör gelişimi olur. Başlangıç aşamasını takip eden olaylar zinciri; bir karsinojen tarafından ya da karsinojen olmayan ancak sadece transforme olan hücreyi etkileyerek o hücrenin çoğalmasını uyaran ajanlar tarafından oluşturulabilir[1,18,19,35,77].



Şekil 2.1: Karsinogenezis sürecinin temel bir şeması (KUMAR,F.; COTRAN,R.S.; ROBBINS,S.L.; Robbins Temel Patoloji, 7'inci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2003, syf:179'dan alınmıştır.)

Karsinogenezis sürecindeki ilk basamak olan başlangıç aşaması çok hızlı gerçekleşir fakat bu başkalaşıma uğrayan hücreler uzun süre değişmeden kalabilirler. Primer olay daha çok genetik materyaldedir ve karsinojen, dokunun stem hücre popülasyonundaki spesifik gen ya da genleri harap edebilir. Fakat başkalaşıma uğramış hücre bölünmeden latent halde kalabilir veya çok yavaş bölünür. Bu hücrenin hızlı bir şekilde çoğalabilmesi, normal hücrelere göre baskın hale gelmesi için uyarıcı ajanların hücreyi etkilemesi gerekir. Pek çok ajan hücrenin bölünmeye girmesinde etkili olur. Ancak sadece uyarıcı ajanlar tümör gelişiminde etkindir. Dolayısıyla tümör gelişimi için hücre büyümesi gerekli olmakla birlikte yeterli değildir. Diğer faktörlerin de hücreyi etkilemesi gerekir. Normal koşullarda hücrenin, stem hücre popülasyonundan ayrılarak fonksiyon gösterebilmesi için farklılaşması gerekir. Uyarıcı ajanların bu farklılaşma sürecini engellediğine ilişkin veriler bulunmaktadır. Büyümeyi hızlandıran uyarılar hücrelerde etkilerini gösterirken bu hücreler aynı zamanda vücuttaki normal büyümeyi inhibe eden faktörlere karşı da duyarlıdırlar. Dolayısıyla hücrenin geleceği, başlangıç aşamasındaki hücrede varolan değişimin etkisi ile faktörleri arasındaki dengeye göre değişir. Bu denge, preneoplastik ve hatta tamamıyla transforme olmuş tümörlerin neden gelişmeden, yaygınlaşmadan kaldığını ve hatta gerilediğini açıklamaktadır[35].

Başlangıç aşamasını geçirmiş ve ortamdaki uyarıcı ajanlardan etkilenmiş hücrelerde aşırı hücre proliferasyonu gerçekleşir ve dokuda normal hücrelere göre transforme olan hücreler daha baskın hale gelir. Bu aşamaya kadar aynı anomaliye sahip hücre popülasyonu vardır. Ancak bu hücrelerden bazılarında oluşan yeni anomaliler o hücrelerin de çoğalmasında seçici bir avantaj oluşturur ve monoklonal olan hücre popülasyonu ilerleyen dönemlerde poliklonal özellik göstermeye başlar[1,35,77].

Dolayısıyla tümörler tüm özellikleriyle birlikte gelişmez. Statik bir hücre popülasyonu iken uyarıcılar ve yeni başkalaşımlar ile daha dinamik hale gelirler ve gelişim devam ettikçe yeni özellikler kazanırlar[1,35,77].

2.2. Tümör Hücresinin Özellikleri

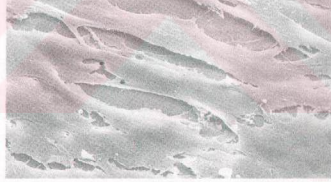
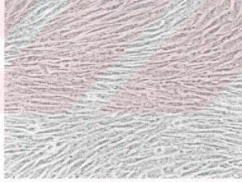
Normal hücrelerde oluşan başkalaşım ile uyarıların birlikte etkileşimi hücrenin tümör hücresi haline dönüşmesine neden olur. Bu değişimler, hücrenin normal fonksiyonlarının bozulması ve farklı özellikler kazanmasında etkilidirler. Tümör hücresinin bu özellikleri genel olarak aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1- Tümör hücreleri çok yüksek hücre yoğunluğu olsa da çoğalmaya devam ederler yani kontrolsüz proliferasyon gösterirler.

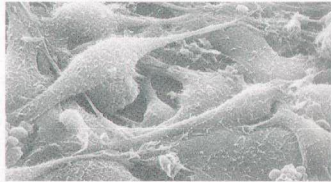
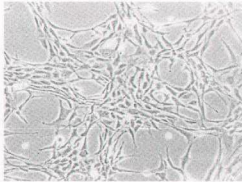
2- Ekstrasellüler büyüme faktörlerine ihtiyaç azalmıştır Proliferasyon için kendi büyüme faktörlerini kendileri üretirler

3- Büyüme faktörlerinin aşırı şekilde üretilmesi, hücre bölünmesinin sürekli uyarılmasına neden olur ki buda otokrin büyümeyi sağlar.

Normal cells



Tumor cells



Şekil 2.2: Kontak inhibisyon. Normal ve tümör hücrelerinin solda ışık, sağda elektron mikroskondaki görüntüsü.(COOPER,M.: *The cell,A molecular approach*, ASM Press Washington ,D.C., 1997, syf:606'dan alınmıştır.)

4- Normal hücrelerde hücrelerarası iletişim vardır ve bu ilişki hücre bölünmesinin kontrolünde çok önemlidir. Ancak tümör hücrelerinde, hücrelerarası iletişim bozulmuştur. Hücre bölünmesinin durdurulması özelliği yitirilmiştir. Bu nedenle, hücrelerde düzensiz çok katlı çoğalma ortaya çıkar.

5- Tümör hücreleri tarafından salgılanan proteazlarla, ekstrasellüler matriks elemanları parçalanır ve malign hücreler komşu dokuya invaze olur.

6- Tümör hücreleri yeni kan damarlarının formasyonunu (anjiogenezis) sağlayan büyüme faktörlerini salgılar. Bu sayede de proliferasyona giren tümör hücrelerine gerekli oksijen ve besin yeni kan damarları ile sağlanır.

7- Hücre farklılaşması yitirilmiştir.

8- Normal hücrelerde yaşanan hücreler apoptoza (Programlanmış Hücre Ölümü) girerken kanser hücrelerinde apoptozis kaybı vardır. Bu nedenle tümör hücreleri normal hücrelere göre daha uzun yaşarlar[18,19,36,49,77].

2.3. Kanser Genetik Bir Hastalık mıdır ?

Önceki bölümde normal hücre ile tümör hücresi özellikleri karşılaştırıldığında her bir özellik ile ilgili çok sayıda protein işlev göstermektedir. Proteinler polipeptidlerden oluşmuştur ve her polipeptid bir gen tarafından kodlanır[13]. Yeni bir protein sentezlenmemiş ise veya az miktarda sentezlenmiş ise ya da yanlış bir protein sentezlenmiş ise o proteinin oluşumunda etkili gen yada genlerde bir başkalaşım söz konusudur. Bu güne kadar elde edilen veriler, karsinogenezis sürecinde farklı türlerde genlerin etkili olduğunu göstermiştir. Bu genler:

- Hücre çoğalmasında hücreler arası sinyal iletiminde rol oynayan proteinleri kodlayan genler
- Mitotik siklus düzenleyicilerini kodlayan genler

- Programlanmış hücre ölümü elemanlarını kodlayan genler
- Kontakt inhibisyon oluşumunda etkili olan elemanları kodlayan genler
- Hasarlı DNA'nın tamirinden sorumlu proteinleri kodlayan genler[90]

Literatürde farklı kanser tiplerinin oluşumunda etkili olduğu düşünülen moleküler mekanizmalar değerlendirildiğinde genel olarak yukarıda maddeler halinde verilen mekanizmalarda etkili gen gruplarında anomaliler rapor edilmiştir. Bu veriler, “Bir kanserin sporadik olarak bireylerde izlenmesine ya da herediter bir özellik göstererek bir ailenin bazı fertlerinde tekrar edilmesine bakılmaksızın kanser genetik orijini olan bir hastalıktır” varsayımını doğrular niteliktedir[90].

Tümör insidansı ve onların malignansiye doğru gelişim oranı, başkalaşım frekansına bağlıdır. Başkalaşım oranı çevredeki mutajenlerden dolayı veya intrasellüler (Replikasyon, rekombinasyon, DNA tamiri) defektlerden dolayı yüksek olabilir. Örneğin nadir gözlenen bir genetik hastalık olan Xeroderma Pigmentosum’lu bireylerdeki ultraviyole ışın nedeniyle DNA’da oluşan harabiyeti tamir edebilen sistemde defekt söz konusudur. İlgili genlerdeki başkalaşımın nedeni enzim üretimi olmamakta, UV orjinli DNA harabiyeti tamir edilememektedir. Bu nedenle cildin zayıf şiddette güneş ışığına maruz kalması halinde bile cilt kanseri gelişme riski normal bireylere göre çok daha yüksektir[1,18,35]. DNA tamiri ve replikasyon hatalarından dolayı kansere yatkınlığın olduğu diğer genetik hastalıklarda da (Bloom Sendromu, Fankoni Anemisi, Ataxia-Telenjektazi) gen defekti germ-hücre dizisi ile sonraki jenerasyona aktarıldığından ve bu nedenle tüm vücutta bulunduğundan bu bireylerde farklı kanser tiplerinin gelişimi söz konusudur ve normal popülasyona göre riskleri çok daha yüksektir. DNA metabolizmasındaki benzer genetik defektler somatik hücrelerde de oluşabilir. Bu defektlere sahip olan bireylerde yeni gen başkalaşımının oluşması başkalaşım oranını artırmakta, o bireylerde kanser gelişme riski anlamlı oranda artmaktadır[1,35].

2.4. Kanserin Genetik Yapısı

Kanserde etkili olduğu düşünölen tüm genler birlikte değerdendirildiğinde 3 ana grup altında toplanır[1,77] :

- 1- Onkogenler
- 2- Tümör süpresör genler
- 3- DNA tamir genleri

Hücre poliferasyonu, direkt ya da indirekt olarak kontrol edilir. Hücre siklusunda, hücrenin bölünmeye girebilmesini belirleyen kontrol noktaları vardır ve hücrenin bu kontrol noktalarından geçip geçmemesine göre hücre bölünmesine girip giremeyeceğı belirlenir. Her iki kontrolde de normal regölatör gen ürünleri, hücre sayısının artırılması ya da hücre sayısı artışının inhibe edilmesine göre gruplandırılır. Dolayısıyla kanserin tipik özellikleri olan kontrolsüz hücre poliferasyonu ve invaze olabilme yeteneğini belirleyen iki başkalaşıma açık nokta vardır[1].

Birincisi, uyarılan geni aşırı aktif hale getirir. Bu başkalaşım dominant özelliktedir, yani genin her iki allelinden sadece birinde oluşan bir başkalaşım bile o genin aşırı aktif hale gelmesi için yeterlidir. Bu başkalaşıma uğrayan gen *onkogen* olarak isimlendirilir. Onkogenlerin normal formları *protoonkogen* adını alır ve her normal hücrede bulunan genlerdir[1].

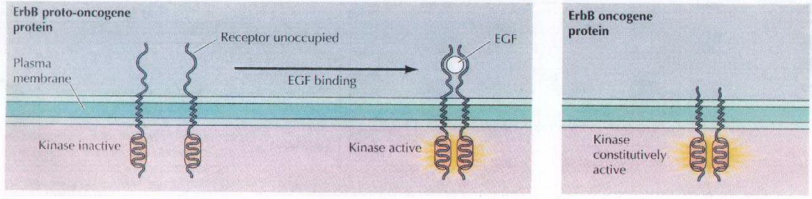
İkincisi ise hücre çoğalmasını inhibe edici geni inaktif hale getiren başkalaşımdır. Bu başkalaşım resesif özelliktedir, yani genin her iki allelinde başkalaşıma uğraması gerekir. Bu genler *tümör süpresör* genler olarak ifade edilir[1].

2.4.1.Protoonkogen-Onkogen Değişimi

Bu güne kadar 80 dolayında protoonkogen saptanmış olup her birinin onkogenik potansiyel göstererek farklı kanserlerin oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir.

Protoonkogenlerin normal, sağlıklı hücredeki görevleri çok önemli olmalıdır ki başkalaşıma uğradıkları zaman zararlı hale gelmektedirler. Protoonkogenlerin büyük bölümü, vücutta hücrelerin sosyal davranışlarını düzenleyen mekanizmalarda görev alan elemanları kodlarlar. Bir hücrenin komşusundan gelen sinyaller hücreyi bölünmeye, farklılaşmaya ya da ölmeye yönlendirir. İşte protoonkogenler, ekstrasellüler ortamdan gelen sinyalleri alarak hücre içerisinde bu sinyalin nükleusta DNA'ya kadar ulaşmasını sağlayan olaylar zincirinde rol alan proteinleri kodlarlar. Protoonkogen ürün listesine bakıldığı zaman hücre sinyal ileti sisteminde görev alan her tip molekülü içermektedir (salgılanan proteinler, transmembran reseptörler, GTP- bağlayan proteinler, proteinkinazlar, gen düzenleyici proteinler vb). Bu moleküllerin hepsi normal şartlarda kompleks zincirler halinde, daha fazla hücre gereksinimi olduğu durumlarda yeni hücre üretimi için sinyalleri alırlar. Ancak başkalaşım bu genlerin fonksiyonlarını değiştirir, hücre gereksinimi olmasa dahi hücrenin bu sinyalleri almasını ve hücre bölünmesinin devam etmesine neden olur[1,74].

erbB protoonkogeni, epidermal büyüme faktörü (EGF) için reseptör kodlayan bir gendir. Ekstrasellüler ortamdan gelen EGF, kendisine özgü reseptöre bağlandığı zaman, reseptörün intrasellüler bölgesi hücre içerisine uyarıcı bir sinyal gönderir(Şekil 2.3). Hücrede erbB genindeki bir başkalaşım bu genin onkogenik potansiyel kazanmasına neden olur. erbB genindeki delesyon, reseptörün EGF'nin bağlanmasına spesifik olan ekstrasellüler bölümünün kaybolmasına neden olur. Bu durumda, ortamda EGF olsun olmasın reseptör kendi intrasellüler bölgesinden hücre içine hücre bölünmesi yönünde devamlı sinyal iletir[1,18].



Şekil 2.3:Erb-B onkogeninin aktivasyon mekanizması. (COOPER,M.: *The cell,A molecular approach*, ASM Press Washington ,D.C., 1997, syf:620'den alınmıştır)

Diğer bir örnekte ras protoonkogeni için verilebilir. Ras proteinleri trozin kinaz reseptörlerinden nükleusa hücre proliferasyonunu ya da farklılaşmasını uyarmak için sinyal ileten geniş bir ailedir. Genin hassas bölgesinde oluşan bir nokta başkalaşım, fonksiyon gösteremeyen bir Ras proteinin sentezlenmesine neden olur ki bu protein, GTP'nin GDP'ye hidrolizini yerine getirmediğinden, kendisine bağlı GTP nedeniyle devamlı aktif durumda kalır ve hücre proliferasyonu için intrasellüler sinyali gereksiz olmasına rağmen nükleusa iletir ve hücre proliferasyonunun devam etmesine neden olur[1,18,53,77,80,90].

Protoonkogenlerin onkogenik potansiyel kazanmasına yol açan mekanizmalar üç ana grupta toplanabilir :

- 1-Delesyon ya da nokta başkalaşım
- 2-Gen amplifikasyonu
- 3-Kromozom yeniden düzenlenmesi

Gen, bir nokta başkalaşım, delesyon, kromozom translokasyonu ya da retroviral DNA gibi bir hareketli genetik elementin eklenmesi ile değişebilir ve farklı bir yapı kazanabilir[1,53].

Değişim genin protein kodlayan bölgesinde olabilir ve aşırı aktif bir ürün oluşumuna neden olur ya da başkalaşım genin komşu kontrol bölgelerinde olabilir ki bu durumda da gen aşırı ürün oluşturur[1].

Nokta başkalaşım nedeniyle protoonkogenin onkogenik özellik kazanmasına en iyi örnek yukarıda da örneklenen Ras protoonkogenidir. Genin hassas bölgesinde oluşan bir nokta başkalaşım nedeniyle tek bir aminoasitin değişimi onkogenik potansiyel için yeterli olmaktadır. İnsan tümörlerinde yapılan çalışmalarda rasH geninin 12. pozisyonunda GGC-Gly kodlanırken nokta başkalaşım sonucu GTC-Valin kodlaması genin onkogenik potansiyel kazanmasına neden olmuştur[18].

İnsan tümörlerinde onkogenlerin aktive olmasında etkili diğer bir mekanizma gen amplifikasyonudur. Gen amplifikasyonu, normal hücrelere göre tümör hücrelerinde daha sık gözlenir. Pek çok tümörün progresyonunda, tümörün daha hızlı gelişmesi ve malign yapısının artmasında onkogen amplifikasyonu önemli rol oynar. Bu gruba en iyi örnek nöroblastomda N-myc; meme ve over karsinomlarında ise erbB-2 onkogen amplifikasyonlarıdır. Amplifiye N-myc kopyaları hızla gelişen agresif tümörlerde sıklıkla gözlenir ki bu da N-myc'nin nöroblastomanın malign özelliğinin artmasında önemli bir rolü olduğunu ifade eder[1,90].

Onkogenik oluşuma neden olan mekanizmalardan bir diğeri de kromozom translokasyonlarıdır. Özellikle lösemi ve lenfomalarda çok sık gözlenen başta kromozom translokasyonları olmak üzere diğer kromozom yeniden düzenlenmeleri solid tümörlerde de rapor edilmektedir[1,90,101]. Burkitt's lenfomada kromozom 8q da lokalize C-myc protoonkogeni ile kromozom 14q'da lokalize IgH genleri arasındaki karşılıklı parça değişimi sonucunda C-myc immüoglobulin lokusuna dahil olmakta ve burada kontrolsüz şekilde ürün oluşturmaktadır[18,35,90]. C-myc geni, büyüme faktör uyarısı durumunda aktif hale gelen bir transkripsiyon faktörüdür ve kontrolsüz ürün oluşturması hücre proliferasyonunu yönlendirmesi için yeterli olmakta ve tümör gelişimi ile sonuçlanmaktadır[90]. Diğer bir örnek kromozom 9q2'da lokalize olan abl protoonkogenin kromozom 22q da lokalize bcr geni ile translokasyonudur[1,18,90].

Kronik myeloid lösemi gelişiminin %90 kadarından sorumlu olan [37,53] bu anomali sonucunda oluşan bcr/abl füzyon proteininde, abl protoonkogen proteinin normal amino terminalinin bcr aminoasit sekansları ile değişimi söz konusudur ve bunun sonucunda bcr/abl füzyon proteini sentezlenir. Abl protoonkogeni Onkogenik aktivite kazanmıştır[1,18,77,90].

Sellüler onkogenlerin aktivasyonu, tümör gelişiminde etkili olan mekanizmalardan birisidir. Diğer mekanizma ise tümör süpresör genlerin inaktivasyonudur[18].

2.4.2. Tümör Süpresör Genler

Tümör süpresör genlerin aktivitesine ilişkin ilk bilgiler Henry Haris ve arkadaşları tarafında 1969'da başlatılan somatik hücre hibridizasyon deneylerinde elde edilmiştir. Normal hücrelerin tümör hücreleri ile füzyonu sonucu oluşan hibrid hücrelerde her iki ebeveyne ait kromozomlar vardır. Ancak çoğu hücre deney hayvanlarında herhangi bir tümör oluşturamamıştır ki bunun nedeni, normal hücreden orjin alan genlerin tümör gelişimini baskılamalarıdır[18]. Tümör süpresör genlerin tümör gelişimindeki mekanizmalarına ilişkin bilgiler 1971'de Knudson tarafından ortaya atılmıştır. Bugün "Knudson hipotezi" veya "iki vuruş" hipotezi olarak ifade edilen bu görüşte tümör süpresör genin kontrolsüz hücre proliferasyonunu kontrol etme ve inhibe etme yeteneği vardır. Bu yetenek ancak ilgili genin her iki allelinde de başkalaşım olması durumunda kaybolur. Tümör süpresör gen kontrol etme fonksiyonunu kaybeder[1].

İlk klonlanan tümör baskılayıcı gen Retinoblastoma (Rb1) genidir. Familial ve sporadik retinoblastoma oluşumu ilk kez Knudson'un "iki-darbe" modeliyle açıklanmıştır. Önerilen modele göre hücrelerin kontrolsüz büyüme avantajı kazanabilmesi için, bu genin (ve diğer baskılayıcı genlerin) her iki allelinin de başkalaşıma uğraması gerekir. İşlev kaybına neden olan (13q14 gen bölgesinde) başkalaşımlar çoğunlukla heterozigosite kaybıyla birlikte olur. Yani, Rb tümör süpresör

genin tek aleli mutant iken diğ er alleli de normal ise bu gen normal aktivitesini göstermektedir. Kişi ilgili Rb geni açısından heterozigottur. Ancak diğ er normal olan allelin de başkalaşıma uğraması durumunda gen fonksiyonunu yapamaz hale gelir. Kişi Rb geni açısından homozigot mutant hale gelmiştir. Heterozigosite kaybı genellikle, yanlış anlamlı (missens) başkalaşımlar, kromozom translokasyonları, tüm genin ya da kromozomun eksilmesi ya da gen dönüşüm mekanizmalarıyla sağlanır. Böylece, bir kansere genetik yatkınlık sendromunda ilk inaktif edici başkalaşım (ilk darbe) germ hücrelerinde, diğ er normal allelindeki ikinci başkalaşım (ikinci darbe) ise bu hücrelerden oluşan somatik hücrelerde ortaya çıkar. Kalıtsal olmayan (sporadik) kanser formunda ise, her iki başkalaşım (her iki darbe) da somatik hücrelerde oluşur[1,35,53,77,90].

Rb tümör süpresör geninin mesane, meme ve akciğ er karsinomlarında da rol oynayan bir tümör süpresör gen olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu gen normal hücrelerde, hücre siklusu ile DNA sentezinin gerçekleşmesinde gerekli olan genlerin ürün oluşturmalarında anahtar rol oynamaktadır. Hücrenin, hücre siklusundaki G₁ kontrol noktasından geçmesi durumunda Rb geni Cdk4/siklin D kompleksleri aracılığıyla aktif hale getirilir ve aktif Rb, DNA sentezinde gerekli olan proteinleri kodlayan genleri ürün oluşturmaları için uyarır. Böylece Rb, DNA sentezi ve hücre siklus progresyonu için gerekli genlerin aktif hale geçip ge memesinde etkili olan bir gendir[1,18,35].

Diğ er bir tümör süpresör gen olan p53 ise hem hücre siklus gelişiminde hem de apoptoziste rol oynayan bir gendir. DNA'da oluşan bir harabiyet, p53' n hemen devreye girerek Cdk inhibitör p21'in ürün oluşturması için uyarılmasına neden olur. p21 hücre siklusunun devam etmesini durdurur ve hücre arrest durumundayken DNA tamir mekanizmaları aracılığıyla harap olan DNA tamir edilir. P53 geninin her iki allelinde oluşan başkalaşım, gen ürününün gerekli uyarıları yapamaz hale gelmesine neden olacaktır. Bu durumda haraplı DNA'ya sahip olan hücrenin arreste girmesi ve tamir edilmesi gerçekleşmeyecektir ki bu da başkalaşım sıklığının artmasına ve hücre genomunun dengesiz olmasına neden olacaktır[1,18,35].

P53'ün diğ er bir fonksiyonu da DNA harabiyetinin tamir edilemediğı durumlarda hücrenin apoptozise girebilmesi için apoptozis mekanizmalarının aktif hale geçirilmesidir. p53 delesyonu olan hücrelerde DNA'yı harap eden ajanlara yanıtta hücre apoptozise giremeyecektir ki apoptozise girememe, pek çok tümörün kemoterapiye rezistans göstermesinde çok etkilidir[18,35].

Tümör süpresör genlerin ürünleri, normal koşullarda hücre döngüsünün negatif düzenleyicisi olarak i  gören proteinlerdir. Kanser oluşumunda aktive olması gereken onkogenlerin aksine tümör baskılayıcı genler inaktif durumdadır. Protoonkogen  r nleri büyümeyi sağlarken, tümör süpresör gen ürünleri anormal büyümeyi ve malign transformasyonu durdururlar. Ancak her iki allelin de fonksiyonu kaybolduğu zaman malignansiye eşlik ederek tümör hücrelerinin anormal proliferasyonuna katkıda bulunurlar[18].

2.4.3. DNA Tamir genleri

DNA çok çeşitli kimyasal reaksiyonlardan geçer. DNA hücre genomunun kalıcı kopyası olduğu için yapısındaki değişiklikler, diğ er hücre komponentleri olan RNA ya da proteinlere göre çok daha önemli sonuçlara neden olur. Ba kala ımlar, DNA replikasyonu sırasında yanlış bazların DNA'ya katılması nedeniyle oluşur. Ayrıca DNA'da spontan veya kimyasal ajanlara, radyasyona maruz kalma durumunda da çeşitli kimyasal değişiklikler ortaya çıkar[18,35]. Hücre genomunun bütünlüğünün korunabilmesi için hücreler harap olan DNA'yı tamir etmek için mekanizmalar geliştirmek durumundadır. Bu DNA tamir mekanizmaları iki ana gruba ayrılır[18] :

- 1- DNA harabiyetinden sorumlu kimyasal reaksiyonun direkt olarak  nlenmesi
- 2- Harap olan bazların DNA'dan çıkarılması

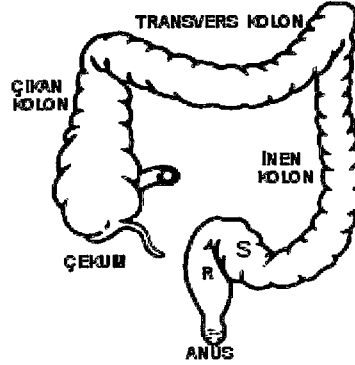
Bu ana gruplar içerisinde hatalı kısım çıkarılarak yapılan (baz çıkarılması,nükleotid çıkarılması) yanlış-eşleşme tamiri, replikasyon sonrası tamir gibi farklı tamir mekanizmaları bulunmakta ve her mekanizmada çeşitli gen ürünleri görev almaktadır[18].

Ancak bu gruba dahil olan genlerde oluşacak başkalaşım, fonksiyonel ürün sentezlenmesini engellediği için DNA tamir edilemeyecek ve genom dengesi bozulacaktır ki bu da karsinogenezde önemli bir etkidir. Örneğin Kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser gelişiminin %50 kadarındaki moleküler patoloji, yanlış-eşleşme tamirinden sorumlu genlerdeki başkalaşım nedeniyle tamirinin gerçekleşmemesidir[18].

2.5. KOLOREKTAL KANSERLER

2.5.1. Kolon ve rektum

Kalın barsak (Kolon) ve rektum sindirim sistemimizin ince barsaklardan sonra gelen kısımlarıdır. Kalınbarsak ortalama 1,5 m uzunluğundadır. Karın içerisinde ters dönmüş U harfi şeklinde karının sağ alt tarafından kör barsak (çekum) ile başlar ve yukarı doğru çıkar (çıkan kolon), karaciğer altından keskin bir dönüşle karını yatay olarak (transvers kolon) geçer. Sol üst köşede yerleşen dalağın altına geldiğinde yine keskin bir dönüş yaparak sol taraftan aşağıya doğru yönelir (inen kolon). İnen kolon, sigmoid kolon denilen kolonun son kısmı ile Rektumla birleşir. Rektum, kalın barsağın genişlemesi sonucu oluşan ortalama 15 cm uzunluğunda olup sindirim sistemimizin son kısmıdır. Anüsle dışarı açılır(Şekil2.4) [58].



Şekil 2.4: Kolonun anatomik yapısı(<http://www.tip2000.com/tedavi/kolon-rektum/main.htm> internet sayfasından alınmıştır)

Kolorektal kanserler gastrointestinal sistemin en çok rastlanan tümörleridir ve ayrıca hem erkek hem de kadında teşhis edilen en yaygın kanser türlerinden biridir[41,63,75,100]. İnsidansı yaşla birlikte artar, 70-80 yaşlarında tepe noktasına ulaşır. Hastalık dağılımında cinsiyetler arasında büyük farklılıklar gözlenmez[100]. Kolorektal kanserli hastalarda esas ölüm sebebinin bu hastalardaki kolorektal kanser metastazlarının olması gerçeğine rağmen gelişmiş batı ülkelerinde de kanser bağlantılı ölümler arasında en sık görülen ölümcül hastalıklardan biridir[26,27,76,80,87,94]. Örneğin Amerika da 2004 yılında yaklaşık 146.940 yeni tanı alan olgu ve 56730 kolorektal kanser nedeni ölüm rapor edildi[75]. Kolorektal kanser insidansı açısından ülkeler arasında anlamlı farklılıklar dikkati çekmektedir ki bu farklılıkta genetik ve çevresel faktörlerin birlikte etkili olduğu ifade edilmektedir[94,96] Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı'nın yaptığı 2000 yılı istatistiklerine göre kolorektal kanser sıklığı, tüm kanserler içerisinde erkeklerde sekiz(Çizelge 2.1), kadınlarda 5'inci (Çizelge 2.2) sırada yer almaktadır. Ölüm nedenleri arasında da aynı sırayı korumaktadır[23,100]. Tüm gastrointestinal tümörler arasında yaşam beklentisi en yüksek olan tümörler yine kolorektal bölge tümörleridir. Bu nedenle özellikle kolorektal kanserlerde prekürsör

lezyonları tanımlamak, bu hastalarda kanser gelişmeden tedavi ve sağlıklı popülasyonda da tarama uygulamak önemlidir.

Çizelge 2.1: Erkeklerde en çok görülen on kanser türü (<http://www.saglikbakanligi.gov.tr> internet sitesinden modifiye edilerek alınmıştır)

ORGANLAR	VAK'A	%	(Yüzbinde)
TOPLAM	19.982	100	58, 18
Akciğer	5.387	26, 96	15, 68
Mide	1.493	7, 47	4, 35
Mesane	1.359	6, 8	3, 96
Larenks	1.086	5, 43	3, 16
Deri	1.035	5, 18	3, 01
Prostat	1.152	5, 77	3, 35
Kemik iliği	646	3, 23	1, 88
Kolon	737	3, 69	2, 15
Beyin	754	3, 77	2, 2
LenfDüğümü	660	3, 30	1, 92
Diğerleri	5.673	28, 39	16, 52

Çizelge 2.2: Kadınlarda en çok görülen on kanser türü
(<http://www.saglikbakanligi.gov.tr> internet sitesinden modifiye edilerek alınmıştır)

ORGANLAR	VAK'A	%	(Yüzbinde)
TOPLAM	13.437	100	40, 16
Meme	3.354	24,96	10,02
Mide	836	6,22	2, 50

Yumurtalık	634	6, 22	1, 89
Deri	797	5,93	2, 38
Kolon	572	4,26	1, 71
Akciğer	692	5,15	2, 07
Serviks	417	3,10	1, 25
Beyin	536	3,99	1, 60
Endometrium	432	3,22	1, 29
Rektum	417	3,10	1, 25
Diğerleri	4750	35,35	14, 35

2.5.2. Kolorektal kanser etiyolojisi

Kolorektal kanser (KRK) etiyolojisi halen daha tam olarak bilinmemektedir. Ancak çok posa bırakan gıdalarla beslenen az gelişmiş toplumlarda, az posa bırakan , yağdan zengin gıdalarla beslenen gelişmiş toplumlara göre daha az görülmektedir. Selenyum ve kalsiyumdan fakir gıda alımı, hayvansal protein ile beslenme ve kolon kanseri gelişimi arasında kuvvetli bir ilişki belirlenmiştir. Safra asitlerinden litokolik, deoksikolik asitlerin tümör gelişimini kolaylaştırdığı yönünde gözlemler vardır. Sebze ve meyve kaynaklı lifsel gıdaların, tahıl türü lifsel gıdalara göre daha koruyucu olduğu belirlenmiştir. Familial polipozis, Gardner sendromu, ülseratif kolit, Chron hastalığı , kolon kanserli bir kişi ile birinci derece kan akrabalığı, geçirilmiş mide rezeksiyonu problemi kolon kanseri riskini artıran etkenler arasında yer almaktadır. Özellikle ciddi bir sağlık problemi olan ülseratif kolitin en önemli komplikasyonlarından biri kolorektal kanser gelişimidir. Kanser riski, ülseratif kolit kliniği ortaya çıktıktan 5-8 yıl sonra belirir ve 10'uncu yılda %1 dolaylarında iken ikinci on yılda %7, üçüncü on yılda %16 ve dördüncü on yılda %53'e yükselir. Bu tablo, çocukluk ve genç yaşlarda ülseratif kolite yakalanan her iki hastadan birinin 50-60 yaş

dolayında kolon kanserine yakalanacağı anlamını taşır. Bu risk faktörlerine ek olarak, özellikle villöz poliplerin prekanseröz oldukları kabul edilmektedir. Bu hastalarda kolorektal kanser gelişimi için bir yatkınlık olduğu ifade edilmektedir[23].

2.6. Kolorektal kanser ve genetik

Kolorektal kanserler batı ülkelerinde morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerinden biridir[43,77,107]. Çok adımlı kanser gelişimi gösteren kolorektal kanserlerin gelişiminde çevresel faktörlerle birlikte genetik faktörler de önemli rol oynamaktadır[23,27,94,100].

Kolorektal tümörler, küçük benign tümörlerden (adenomatöz polipler) malign kanserlere (karsinom) doğru klinik ve histopatolojik aşamalar zincirinden geçerler. Bu gelişimde onkogen aktivasyonu ve tümör süpresör gen inaktivasyonundan kaynaklanan genetik değişimler rol oynar[18,75,107]. Bazı ailelerde kolorektal kanser gelişme sıklığı normal popülasyona göre daha yüksektir. Bu ailelerde kolorektal kanser gelişiminde etkili olan genler açısından bir familial birikim, dolayısıyla da bir yatkınlık söz konusudur. Özellikle birinci derece akrabalarında KRK öyküsü olan bireylerde hastalığın ortaya çıkma riski çok artar[46,75].

Genel olarak kolorektal kanserli (KRK) hastaların yaklaşık %75-85 kadarı ailede herhangi. bir kalıtsal hasatlık öyküsü olmayan, kanserin sporadik geliştiği hastalardır. Geri kalan %15-25'i ise bir KRK aile hikayesine sahiptir. İkinci grupta yer alan olgularda genetik birikimden kaynaklanan bir yatkınlık, aynı ortamda maruz kalınan ekstrinsik faktörler ya da her ikisi birlikte KRK gelişiminde etkili olmaktadır[23,46,75,90,100].

Kolorektal karsinom gelişiminde rol oynayan başkalaşmış gen ya da genlerin germ hücreler aracılığıyla sonraki jenerasyona aktarımı söz konusudur. Familial kolorektal kanserler iki ana grupta toplanabilir. Bunlar multipl benign

kolorektal poliplerin (polipozis) bulunması ile karakterize kanserler ile polipozisin olmadığı kanserlerdir[1,23,46,49].

Bu güne kadar çok sayıda polipozis sendromu tanımlanmıştır: Familial Adenomatöz Polipozis Koli(FAP), Peutz-Jegher sendromu, Cronkhite-Canada sendromu ve hiperplastik polipozis. Bunlar arasında en iyi bilineni olan FAP otozomal dominant kalıtım gösteren kalıtsal bir hastalıktır. Yaşamın ikinci ve üçüncü dekatlarında yüzlerce-binlerce adenomatoz polip gelişimi vardır. FAP tanısı olan bireyde çok sayıdaki polipten ötürü 40 yaş dolaylarında kanser gelişme riski yüksektir[23,33,35,49,80,90,100,107].

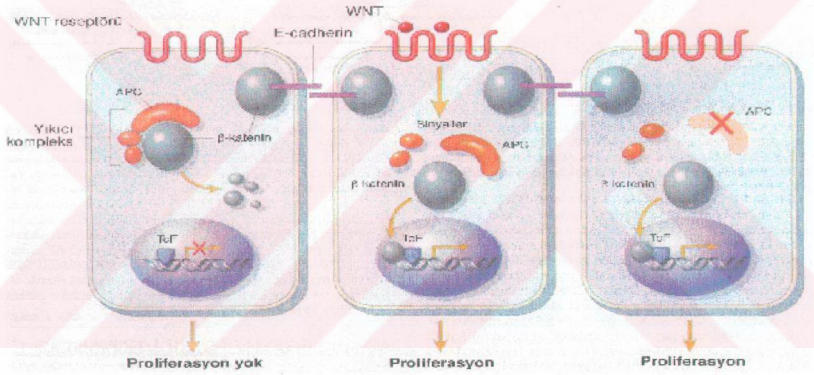
Gardner sendromu ile Turcot sendromu, FAP'ın varyantlarıdır ve bu varyantların aynı temel hastalığın farklı derecelerindeki görünüşleri olduğunu ifade eden kaynaklara rastlanmaktadır[35,77]. Gardner sendromu ile FAP'a spesifik genlerin aynı kromozom bölgesinde (5q21) lokalize olması, diğer taraftan Turcot sendromu geninin bu bölgeye bağlı bir gen olması ortaya atılan bu görüşü destekler niteliktedir[77].

Familial adenomatoz polipozisin moleküler patolojisinde hücre içi sinyal iletiminde rol oynayan APC (5q21) tümör süpresör geninin başkalaşımı rol oynamaktadır[33,49,57,80,90,107].

2.6.1. Familial adenomatöz polipozis koli (FAP)

HNPCC gibi otozomal dominant geçiş özelliğine sahip FAP HNPCC'den daha seyrek görülmektedir. HNPCC den bir diğer farkıda tüm mukoza yüzeyini halı gibi kaplayan 500-2500 adet kolonik poliplerin görülmesidir. Bu polipler erken erişkin dönemde ortaya çıkmaktadır ve ilerleyen yaşla birlikte 30-50 yaşlarında kolorektal kanser geliştirirler. FAP hücre içi sinyal iletiminde rol oynayan bir protein olan ve çok fonksiyonel APC (5q21) geni mutasyonlarına bağlı olarak gelişmektedir[33,80,107]. Tümör süpresör gen olan APC'deki başkalaşım geni inaktifleştirir ki bu da sitoplazma

da β -catenin birikimine neden olur. APC, stabil hücre-hücre bağlantılarında plazma membranı ile iskelet arasındaki ilişkiden sorumludur. APC, hücrelerin plazma membranları arasında aktin filamentleri ile bağlantı kuran β -catenine bağlanır(Şekil 2.5). Heterozigosite ile (Loss of heterozigosity=LOH) APC ikinci kopyasının somatik inaktivasyonu, mutasyonu yada metilasyonu sayesinde sitoplazmada β -catenin birikmesine ve sonuç olarak ta C-Myc, WNT ler ve diğer proteinlerle interaksiyon yaparak T-hücre faktör yolunun anormalliklerine neden olur. β -catenin'in önemi T-hücre faktör (TCF), transkripsiyon faktör ailesine bağlanması ve gen ekspresyonunu aktive etmesidir[33,80,107].



Şekil 2.5: Beta kateninlerin fonksiyon ve stabilitesinin regülasyonunda APC'nin rolü.(KUMAR,V.; COTRAN,R.S.; ROBBINS,S.L.; Robbins Temel Patoloji, 7'inci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2003, syf:186'dan alınmıştır.)

APC proteininin kolorektal karsinoma sürecinde önemli olduğu düşünülen fakat ihmal edilmiş diğer bir özelliği de onun mikrotübüllerle ilişkisi ve kromozom segregasyonu sırasındaki rolüdür. Son yapılan çalışmalar mitoz süresince kinetokor içersine gömülü mikrotübüllerin sonunda APC biriktiğini göstermiştir. APC-mikrotübül

bağlanma domaininin, mutant hücrelerdeki eksikliği, anormal kromozom segregasyonu ve kromozomal instabilite ile sonuçlanır. Bu nedenle normal APC proteininin, kinetokor mikrotübüllerinin sonundaki stabilizasyonda rol oynadığı ve mikrotübüllerden oluşan mikrofilamentlerin kromozomlara bağlanmasına yardım ettiği öne sürülmektedir[80].

2.6.2. Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser (HNPCC)

Otozomal, dominant geçiş özelliğine sahiptir. Aynı aile içinde bir çok bireyde görülür. FAP'dan farkı KRK'in tümünün % 2-4'ü HNPCC'dir[46,100] Şimdiye kadar tanımlanan HNPCC genleri DNA'daki yanlış eşleşme tamirinden (DNA mismatch repair-DNA MMR) sorumlu genlerdir. Bu genlerdeki kalıtsal başkalaşım lar ilgili proteinlerdeki işlev kaybına yol açmakta ve hücrelerin DNA tamir kapasiteleri önemli oranda azalmaktadır. Başkalaşımı taşıyan bireylerin normal hücrelerinde yeterli miktarda DNA tamiri yapılabilmektedir. Ancak tümörlü hücrelerde normal allelin kaybı sonucu DNA tamiri yapılamaz hale gelir, yoğun ve yaygın başkalaşım birikimi ortaya çıkar. Bu somatik başkalaşım lar insan DNA'sında çok sık rastlanan tekrar dizilerinde kolayca görülebilmektedir. DNA tamir genlerinde heterozigot başkalaşım taşıyan bireylerin hastalık geliştirme riski toplumdaki diğer bireylere kıyasla daha yüksektir ve KRK daha genç yaşta (ortalama 42) ortaya çıkmaktadır ve adenomatöz polipler bulunmamaktadır. Yaşla orantılı olarak artan hastalık riski %85-90 arasında değişmektedir[23,46,49,72,80,83,84,100,107].

HNPCC'ye neden olan kalıtsal başkalaşım lar başlıca iki gende gözlenmiştir. Şimdiye kadar belirlenen başkalaşım ların %49'u hMLH1 geninde, %45'i ise hMSH2 geninde bulunmuştur[46]. Bunun yanında küçük sayıdaki hMSH6, PMS1 ve PMS2 genlerindeki başkalaşım lar da görülmektedir. Bu genler mikrosatellit tekrar bölgelerindeki azalma ve artışların tamirini, kesimini ve tanınmasını sağlarlar. Bu kesme-tamir mekanizmasındaki başarısızlık bu bölgedeki tekrar dizilerinin sayısındaki artış ve azalmaların yeniden düzenlenmesine ve PCR ile amplifiye edildiğinde yeni allelerin görülmesine neden olur. DNA'daki bu başkalaşım lar frame-shift (çerçeve kayması) başkalaşım larına ve fonksiyonel olmayan anormal protein üretimine neden

olmaktadır[3,80,84,100,107]. Türk toplumunda HNPCC'ye yol açan başkalaşım larla ilgili olarak çok az çalışma olmakla birlikte şimdiye kadar belirlenen başkalaşım lar sadece hMLH1 geninde bulunmuştur[46].

Kolorektal kanserlerin geri kalan %85 kadarı sporadik gelişen kanserlerdir ve sporadik kanserlerde de çeşitli onkogen ve tümör süpresör genler etkilidir[75,107].

2.7. Kolorektal kanserlerdeki genomik instabilite

Kolorektal kanser gelişmesinde pek çok genetik değişim birikiminin gözlemlendiği kabul edilmektedir. Genetik instabilite, kanser patogenezi süresince çok sayıda genetik değişimlerin birikiminde önemli rol oynamaktadır. Kolorektal karsinomada iki önemli genetik instabilite formu tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi kolorektal kanserlerin yaklaşık %13'ünde olan ve DNA yanlış-eşleşme (Yanlış eşleşme repair : MMR) tamir yetersizliğinin yol açtığı mikrosatellit instabilitesidir (Microsatellit instability: MSI)[27,75,83,94,106]. Mikrosatellitler, kısa, genomda özellikle intronik bölgeler boyunca lokalize olmuş tekrarlayan mononükleotid, dinükleotid ve trinükleotid dizileridir. Bu tekrarlayan elementler yanlış replike olur yada yanlış-eşleşme tamir proteinleri tarafından tamir edilemezse MSI meydana gelir. Bu genomik instabilitenin, tümörün başlamasında ve gelişiminde önemli rollere sahip olan onkogen ve tümör süpresör genlerde hızlı bir somatik başkalaşım birikiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir[3,80]. Geri kalan %87 ise genetik materyaldeki özellikle APC ve β -catenin başkalaşım larının görüldüğü hücre bölünmesi süresince artan büyük kazanç ve kayıpların görüldüğü kromozomal instabilitedir(Chromosomal instability:CIN)[36].

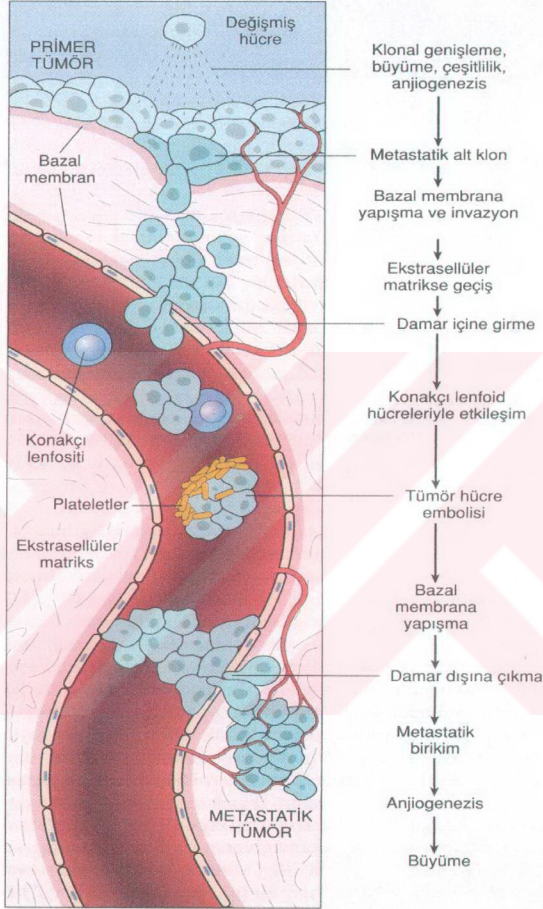
Kromozomal instabilite kanserlerindeki anahtar değişimler, kromozom sayılarındaki (anöploidi) geniş yayımlı değişimlerdir. Kromozom 5q, 18q ve 17p kromozom parçalarının moleküler seviyedeki belirlenebilir kayıpları ve K-Ras onkogeninin başkalaşım unu içerir. Bu kromozom kayıplarındaki önemli genler APC (5q), DCC/MADH₂/MADH₄ (18q) ve TP53(17p) dir ve kromozom kayıpları moleküler ve kromozomal seviyedeki instabilite ile ilişkilidir[75]. İnstabilitenin bu tipine

kormozom segregasyonu boyunca içinde telomer disfonksiyonu, DNA çift-iplik kırık tamir gibi mekanizmalar da neden olabilir[27]. Kromozomal instabilite daha sıklıkla sporadik kolorektal kanserlerde görülmektedir[106].

2.8. Kolorektal kanser metastazları

Kolorektal kanserler, kanser nedenli ölümler arasında en üst sıralarda yer almakla birlikte, ölümlerin esas nedeni, genellikle bu karsinomların gelişimleri sırasındaki metastazlarıdır [27,64,76]. Metastazlarda oluşan genetik değişimlerin belirlenmesine ilişkin çalışmalar çok sınırlı olmakla birlikte son yıllarda yapılan birkaç çalışmada, metastazlar tümör hücrelerinin bir primer neoplaziden uzak ikinci bir bölgeye yayılması ve burada çoğalması olarak tanımlanır. Bu metastazlar lokal bir tümör büyümesinden metastatik bir öldürücüye kadar kanser gelişimi süresince önemli bir aşamayı göstermektedir[76].

Bu aşamalar hücrelerin primer tümörden çevre dokuları istilası, dolaşım sistemine penetrasyonu (kan dolaşımına ya da lenfatik sisteme), hedef organların kapiler yüzeylerinin içlerine implantasyonu, damar ağındaki düzeni sonucunda ikincil yerleşim bölgesindeki proliferasyonunu içermektedir (Şekil 2.6) [76]. Bu noktada metastazların oluşması için gerekli kompleks olaylar zincirinin tamamlanmasında sınırlı sayıda gen olduğu ifade edilmektedir[4,76,93].



Şekil 2.6: Metastatik olaylar zinciri.(KUMAR,V.; COTRAN,R.S.; ROBBINS,S.L.;

Robbins Temel Patoloji, 7'inci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2003, syf.190'dan alınmıştır.)

2.9. Kolorektal Lezyonlar

Pataloglar kolorektal lezyonları üç grupta sınıflandırır [75]:

- Neoplastik olmayan polipler
- Neoplastik polipler
- Karsinomalar

2.9.1. Neoplastik olmayan polipler

Polip, barsak lümenine doğru çıkıntı oluşturan tümöral bir kitledir. Polipler mukozanın anormal maturasyonu, inflamasyonu yada yapısal bozukluğu sonucu meydana gelebilir. Bunlar non-neoplastik poliplerdir ve malignite potansiyeline sahip değildir[77]. Hiperplastik polipler bu poliplere örnek olarak verilir. Bununla birlikte araştırmalarda juvenil polipler ve hiperplastik poliplerle etkilenmiş ailelerde kanser riskinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu polipler MIN gösterirler ve yanlış eşleşme tamir yolu ile kolon kanserine kaynak olabilirler[75,77].

2.9.2. Neoplastik polipler

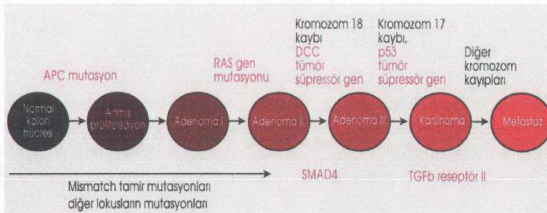
Epitelyal proliferasyon yada displazi sonucu oluşan poliplerdir. Bunlara adenomatoz polip yada adenom denir. Bunlar gerçek neoplastik ve karsinom öncüleridir. Adenomlar genelde saplı küçük tümörlerden, çoğunlukla şekli büyük lezyonlara kadar çeşitli yapı ve büyüklüklerde neoplastik yapılardır. Sporadik adenomların ailesel olma eğilimi tanımlanmıştır. Birinci derece akrabalarda adenom olma riski normalin dört katıdır. Adenomlu bir hastada, kolorektal karsinom gelişimi riski ise normale göre dört kat artmıştır. Bütün adenomatoz lezyonlar, epitelyal pnoliferasyondan ve hafiften ağıra karsinom transformasyonuna kadar değişen derecelerde displaziden kaynaklanan lezyonlardır. Ayrıca sporadik invaziv kolorektal

karsinomların çoğunun daha önceden var olan adenomatoz lezyonlardan kaynaklandığını gösteren güçlü kanıtlar da vardır[75,77].

Kolorektal tümörler benign tümör büyümesinden invaziv karsinoma kadar geniş bir neoplazi spektrumu gösterir ve çoğunlukla da epitelyal türemiş tümörlerdir. Örn; Adenomlar ,adenokarsinomlar[36,75].

2.10. Adenoma-karsinoma dizisi

Fearon ve Vogelstein, 1992 yılında kalın bağırsaktaki adenom- karsinom süreci için bir genetik model öne sürdüler. Bu modele göre, kolorektal karsinom, tümör süpresör genlerin başkalaşım nedeniyle inaktive olması ve onkogenlerin de yine başkalaşımdan ötürü aktive olması ile adenomdan karsinoma doğru bir gelişim gösterir. Bu model pek çok çalışma ile desteklenmiş ve epigenetik değişimlerin de özellikle tümör süpresör gen inaktivasyonunda rol oynadığı bu mekanizma zincirine ilave edilmiştir(Şekil2.7) [27,32,42,75,80]. Adenom-karsinom dizisi terimi spesifik poliklonal genetik anomalilerin oluşumu ile normalden diplastik epitelyuma ve karsinomaya gelişimi basamaklar halinde tanımlayan bir algoritmdir. Bu kavram; invaziv kanserin kaynağını çalışma olanağını sağlamasının yanı sıra prekürsör lezyonların endoskopik alınımları ile KRK' i önlemede de önemli bir görev üstlenmektedir[80].



Şekil 2.7: Adenoma Karsinoma dizisi (NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F.: Thompson&Thompson Tıbbi Genetik, Güneş Kitabevi, 2005, syf:329'dan alınmıştır.)

Adenokarsinomlar kolorektal karsinomların büyük çoğunluğunu, gastrointestinal yoldan kaynaklanan tüm malignitelerin ise %70'ini oluşturmaktadır[77].

Kolorektal karsinomlar çoğunlukla bir adenomatoz polip zemininden çıkar. Genellikle 60-70 yaşlarda görüldüğü en yüksek seviyeye ulaşmaktadır.

Etkili olduğu düşünülen çevresel faktörler;

- 1) Emilemeyen bitkisel liflerden fakir içerik
- 2) Zengin bir işlenmiş karbonhidrat içeriği
- 3) A, C, E vitaminleri gibi koruyucu mikro besinlerin az tüketilmesi
- 4) Etteki gibi yüksek yağ miktarı
- 5) Selenyum ve Ca'dan fakir gıda alınıması
- 6) Safra asitlerinden litokolik ve deoksikolik asitlerin tümör gelişimini kolaylaştırdığı
- 7) Daha önce adenom çıkartılması
- 8) Aşırı yağlı diyet, sigara alımı
- 9) Şişmanlık, kolesistektomi geçirmek
- 10) İleri yaş, uzun süreli ülseratif kolit

Genetik açıdan bakıldığında, kolon karsinogenezisinde birbirinden farklı 2 yol olduğu düşünülmektedir. Her iki yolda da birden fazla sayıda başkalaşım olmakta ve aşamalı şekilde bu anomaliler birikim göstermektedirler[44,77]. Bununla birlikte başkalaşımın gerçekleştiği genler ile başkalaşımın birikim mekanizmaları birbirinden farklıdır[77].

I.Yol

APC/ β katenin yoludur. Bir seri onkogende ve tümör süpresör gende başkalaşımın aşamalı olarak gerçekleşmesine ve birikimine neden olan kromozomal dengesizlik ile karakterizedir. Bu yolda önce kolonda lokalize bir epitel proliferasyonu

gerçekleşir ve takibinde oluşan küçük adenomlar progresif olarak genişlerler. Bir süre sonra displastik hale gelen adenomlar sonunda invaziv kansere dönüşürler.

Adenom-karsinom dizisinin varlığı sporadik kolorektal kanserlerin %80'inde bulunmaktadır.

Bu olayı aşağıdaki gibi özetleyebiliriz;

2.10.1. APC tümör baskılayıcı genin kaybı

Bu adenom oluşumundaki en erken olaydır. Adenomların oluşması için APC'nin her iki kopyasının da kaybedilmesi gerekir. APC proteinin fonksiyonları β -catenin ile ilişkilidir. Normal APC, β -catenin yıkımını sağlarken, APC fonksiyon kaybı durumunda β -catenin birikir ve nükleusta yer değiştirerek Myc ve Cyclin D1 gibi genlerin ürün oluşturmalarını aktifleştirir ve hücre proliferasyonunu hızlandırır. Sporadik kolon kanserlerinin %80'inde APC başkalaşımı mevcuttur[3,8,33,77].

2.10.2. K- ras başkalaşımı

K-ras, 3 Ras gen ailesinden birisidir. Aktif guanozin trifosfat ile inaktif guanozin difosfat arasında bir sinyal iletim molekülünü kodlar. Başkalaşıma uğramış RAS aktif halde sabit kalır ve mitotik sinyalleri iletirken apoptozu engeller. Bunlar tümüyle APC kaybından sonra meydana gelir. K-ras başkalaşimleri, kanser olmayan bireylerdeki adenomlarla karşılaştırıldığında; ras geni başkalaşımı senkronize kanserli kolonlardaki adenomalarda yüksek sıklıkta meydana gelmektedir. Üstelik, K-ras başkalaşimleri tümörü olan kolonlarda, histolojik olarak normal mukozada belirlenmiştir. Ayrıca K-ras başkalaşımının analizi yüksek risk altındaki bireyleri belirlemek kolorektal kanserin erken dönemde teşhisi için kullanılabilecek bir belirleyici (marker)dir. K-RAS başkalaşimleri genellikle 1cm'den büyük adenomlar ve karsinomlarda bulunmaktadır[8,33,77].

210.3. 18q21delesyon:

17p kolorektal kanserlerde en yaygın allelik kayıp bölgesi iken , ikinci en yaygın bölge de olguların %70'inde delesyona uğrayan kromozom 18q bölgesidir. Bu bölgede lokalize 3 gen bulunmaktadır. Bunlar DCC (deleted in colon carsinom), DPC4/SMAD4 (deleted in Pankreatic carsinom) ve SMAD2'dir. DCC; netrin 1denilen ve aksonal iletide görev yapan adezyon molekülü benzeri bir molekül kodlar. DPC/SMAD4 ve SMAD2 ise transforming growth 4 faktör β (TGF- β) sinyal yolunda görevlidir. Bunlardaki bir değişim de (kayıbı) hücre büyümesinin kontrolden çıkmasına yol açar[8,77,80].

210.4. TP53 kaybı:

p53 geni kanserlerde sıklıkla değişime uğrayan bir gendir [46].Kolon kanserlerinin %70-80'inde bu genin kaybı bulunmaktadır. Fakat bu genin kaybı adenomlarda az rastlandığı için genellikle karsinogeneze rol oynadığı düşünülmektedir. P53 'deki ya da kromozom 17p allelik kayıp değişimleri, adenomaların %4-26'sında, adenomatoz poliplerin %50'sinde ve adenokarsinomların %50-75'inde rapor edilmiştir[8,77,80].

II. YOL

Bu yol DNA yanlış-eşleşme tamir genleri ile ilişkilidir. APC/ β -cateninindeki gibi başkalaşım birikimi var. Fakat genler farklıdır. Ayrıca bunlarda tanımlanmış morfolojik değişimler yoktur. Bu yolla gelişen kolorektal kanserlerde başlangıç noktası yanlış eşleşmiş DNA nükleotid bazlarının ve normal DNA replikasyonu sırasında sıklıkla meydana gelen küçük insersiyon ve delesyonların düzeltilmesinden sorumlu DNA yanlış eşleşme tamir genlerinin inaktivasyonu ve bunun sonucunda da DNA tamirinde meydana gelen aksaklıklardır. Bu genler MSH2(2p16), MSH6(2p16), MLH1(3p21), PMS1(2p31) ve PMS2(7q11)'dir ve bunların herhangi

birindeki kalıtsal başkalaşım herediter non-polipozis kolon kanseri (HNPCC) ile sonuçlanır. Bunlardan sporadik kolon karsinomla en ilişkili gen MLH1'dir. DNA yanlış eşleşme tamir genlerin kaybı sonucu mikrosatellitler DNA replikasyonu sırasında dengesiz hale gelir ve mikrosatellit instabilitesi/değişkenliği oluşur. Bunun sonucunda hatalı DNA sentezi ve sonuçta da genom instabilitesi meydana gelir. Bu nedenle bu yola MSI yolu da denir. Mikrosatellit dizilerinin çoğu genlerin kodlama yapmayan bölgelerinde olduğu için bunlarda meydana gelen başkalaşımın zararsızdır. Bununla birlikte bazı mikrosatellit dizileri, hücre büyümesinin düzenlenmesiyle ilişkili genlerin kodlama yapan yada promotor bölgelerinde bulunmaktadır. Bu genler arasında bulunan tip 2 TGF- β epitel hücrelerinde büyümeyi engellerken BAX geni de apoptoza neden olur. Yanlış eşleşme yapan genlerde başkalaşım, diplastik hücre proliferasyonuna yol açarak kolorektal karsinomların ortaya çıkmasına neden olur[3,77,106,107].

2.11. Kolorektal kanserlerde karşılaşılan Kromozom Anomalileri

Solid tümörlerde tekrarlayan kromozom aberasyonlarının identifikasyonu, lösemi ve lenfomalar kadar sık değerlendirilememiştir. Çünkü çalışmalarda başarı oranı düşük olmakla birlikte çok zaman ve emek gerektirmektedir. Kromozomlar elde edildiği zaman morfolojileri genellikle kötüdür ve bu nedenle kompleks anomalilerin tanısında sıkıntı yaşanmaktadır. Ancak bugüne kadar solid tümörlerde yapılan sitogenetik analizlerde, tekrarlayan sayısal/yapısal kromozom anomalileri rapor edilmiştir[35]. Bulgular, tümörlerdeki hücre farklılaşmasının azalması ile kromozom anormali sıklığının arttığı yönündedir[35]. Kolorektal kanserlerde de tekrarlayan sayısal/yapısal kromozom anormali sıklığı yüksek orandadır. İncelenen kolorektal kanserlerin %90 kadarında kromozom aberasyonu saptanmıştır ki bu, kolorektal kanserlerde kromozom instabilitesinin mikrosatellit instabilitesine göre daha sık olduğunu destekler niteliktedir[43,72,75,83,88]. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda sayısal/yapısal anomaliler özellikle kromozom 1,7,8,13,17,18 ve 20 de saptanmıştır [4,7,11,26,43,64,73,75,76,83,86,87,94].

Bu tümörlerde kromozom ya da kromozom bölgesi artış ya da kayıpları farklı oranlardadır. Kromozom 18q kaybı ile kromozom 7 artışı diğer anomalilere göre daha sık gözlenen anomalilerdir. Sıklıkları sırasıyla,%26-30 ve %25 dolaylarındadır. Bu anomalileri kromozom 17 (%13), 14(%12), 22(%12) kayıpları ile kromozom 20(%14) ve 13(%12) artışları izlemektedir[4,7,11,22,26,43,64,73,75,76,83,86,87,94].

Adenomlardaki en sık anomali olan trizomi 7, lezyonların %40 kadarında bulunmaktadır ve çoğunlukla tek aberasyondur[14,15], ve 7'inci kromozom üzerinde lokalize aday kolorektal tümör süpresör gen olan DRA (downregulated in adenoma) sıklıkla kolonik mukozada eksprese olmaktadır. Bu genin normalden az ürün oluşturması tümör progresyonu ile yakın ilişki gösterir[6,104]. Adenomlarda kromozom 13(%30) ve 20(%17) artışı ile, kromozom 18 (%13) kaybı sık görülmektedir. Buna karşılık kromozom 14, adenomların %13'ünde kopya artışı olarak karşımıza çıkmasına rağmen karsinomalarda kromozom 14 delesyonu gözlenmektedir. Adenomlarda sık gözlenen diğer yapısal anomali 1p delesyonudur ve çalışmalarda 1p36'nın delesyona uğrayan bölge olduğu rapor edilmiştir. Bu bölgede yine bir aday tümör süpresör gen bulunmaktadır[83].

Diğer kanserlerde olduğu gibi primer kolorektal karsinomlarda da kromozomal aberasyonlar rasgele değildi [72]. Onkogen amplifikasyonları homojen boyanan bölgeler ve (HSR) çift nokta (DM: Doble Minute) yapılar ile kromozom düzeyinde kendilerini ifade ederler ve ileri düzey solid tümörlerde daha sıklıkla gözlenmekle birlikte kötü prognoz belirleyicisidirler. Çok sık amplifikasyon gözlenen bölgeler arasında 8q23-24, 12p ve Xp28 vardır. Bu kromozom bölgelerinde birkaç aday onkogen bulunmaktadır. Kromozom 8q'nun distalinde, c-myc onkogeni yüksek seviyede amplifikasyon göstermektedir ve PRL-3 kolorektal kanser metastazlarında sıklıkla eksprese olmaktadır. Kromozom 12pde lokalize CCND (CyclinD2) ve K-ras onkogenleri de kolorektal karsinogenezisde rol oynadığı bilinen diğer onkogenler arasındadır. Xq28 amplifikasyonu da potansiyel hedef gen olarak belirlenmiştir[72].

Gözlenen kromozom anomalileri ile hastalığın prognozu değerlendirildiğinde yukarıda ifade edilen onkogen amplifikasyonlarının yanı sıra kromozom 17p ya da 18q delesyonlarının zayıf prognozla ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Ancak bu konudaki çalışmalar henüz yetersizdir[25,26,72].

2.12. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon

Tijo ve Levan tarafından 1956'da insan kromozom sayısının 46 olduğu ortaya atıldıktan, Down sendromu tanısının kromozom analizi ile konmasından sonra kromozom analizleri kısa zaman içerisinde yaygın olarak kullanılan bir genetik yöntem olmuştur. Tanı ve araştırma amaçlı analizlerde kullanılmış, pek çok kromozom sendromunun tanısı gerçekleştirilmiştir. Bugün sitogenetik analiz, dünyada altın, standart yöntem olarak prenatal/postnatal tanıda, kanser sitogenetiğinde kullanılmaktadır. Ancak sitogenetik analizlerde ışık mikroskopunun rezolüsyon gücünün izin verdiği oranda yapısal kromozom anomalisinin tanısı mümkün olmaktadır. En iyi koşullarda profaz kromozomlarında yüksek rezolüsyonlu bantlama ile dahi 4Mb ve üstü büyüklüğündeki anomalilerin tanısı kromozom analizi ile konabilmektedir. Dolayısıyla 4Mb'dan daha küçük delesyon, artma, translokasyon gibi anomalilerin tanısı klasik sitogenetik yöntemler ile mümkün olmamaktadır. 1990'lı yıllarda dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanan ve sitogenetik analizlere destek olan Floresan İn Situ Hibridizasyon tekniği ile tanısı konabilen anomali büyüklüğü 2Mb'a kadar indirilmiştir. Belirli bir gen yada DNA dizisinin kromozom üzerindeki varlığını ve pozisyonunu belirlemek amacıyla kullanılan FISH tekniği, sadece kromozomlar değil interfaz nukleuslarında da analizi olanaklı kıldığı için kısa süre içerisinde prenatal/postnatal tanı ve kanser genetiği alanlarında kullanımı yaygınlaşmıştır[12,20]. Moleküler sitogenetik olarak ifade edilen bir alanın gelişmesini de sağlayan bu yöntemin pek çok avantajının yanında sadece genomdaki şüpheli bölgelerin analizinin yapılabilmesi, ama tüm genom hakkında bilgi verememesi özellikle kanser genetiğinde bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Kompleks kromozom aberasyonlarının sıklıkla görüldüğü tümör örneklerinde FISH ile sadece bilinen anomaliler değerlendirilebilmekte, olguya spesifik yeni değişimler hakkında bilgi sahibi

olunamamaktadır. Ayrıca çok sayıdaki anomaliyi değerlendirmek için çok sayıda hibridizasyon işlemi uygulamak gerekmektedir[98].

Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (KGH/Comperative genomic hybridisation=CGH), tek bir hibridizasyonla incelenecek örneğin tüm genomu hakkında bilgi veren bir moleküler sitogenetik yöntemdir. Temelde bu yöntemde farklı florokromlarla işaretlenmiş örneklerin hibridizasyonundan oluşan bir FISH yöntemidir. Ancak kullanılan materyal olgunun DNA sıdır. Normal bir DNA ile karşılaştırılarak normal DNA ile olgu genomundaki delesyon ve/veya artış gösteren kromozom bölgelerinin hibrit oluşturmama özelliğinden yararlanılır[20,83,85,105].

Özellikle solid doku tümörlerinden kromozom elde etme yöntemlerinin zaman ve emek gerektirmesi, başarı oranının düşük olması, KGH tekniğinin solid doku tümörlerinin analizinde yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur[20,35].

2.12.1.YÖNTEMİN AVANTAJLARI

1-İncelenecek olgu örneğinden DNA elde edilir. Örneğin kültüre edilme zorunluluğu yoktur. Az miktardaki örnekle dahi analiz yapılabilir.

2-Her türlü örnekle analiz yapılabilir (taze doku, parafinize doku, tek hücre vb.)

3-Tek bir hibridizasyonla genomdaki artış ve eksilmelerin tanısı konabilir. Uygulanan yöntemin mikroskopik incelemesinde,mikroskobun bağlı olduğu bir bilgisayar sistemi ve programı aracılığıyla artış/kayıp olan kromozom yada kromozom bölgesi belirlenir.

4-Orjini bilinmeyen marker kromozomların orjini belirlenebilir.

5-Prenatal/ Preimplantasyon/ Postnatal tanıda beklenmeyen kromozom bölge anomalilerin tanısı konur[50,51,55].

2.12.2.YÖNTEMİN DEZAVANTAJLARI

1-Dengeli anomalilerin tanısı konamaz

2-Düşük orandaki mosaisizmin tanısı konamaz

3-Bireydeki poliploidiyi artış olarak gösterir, ploidi derecesini veremez.

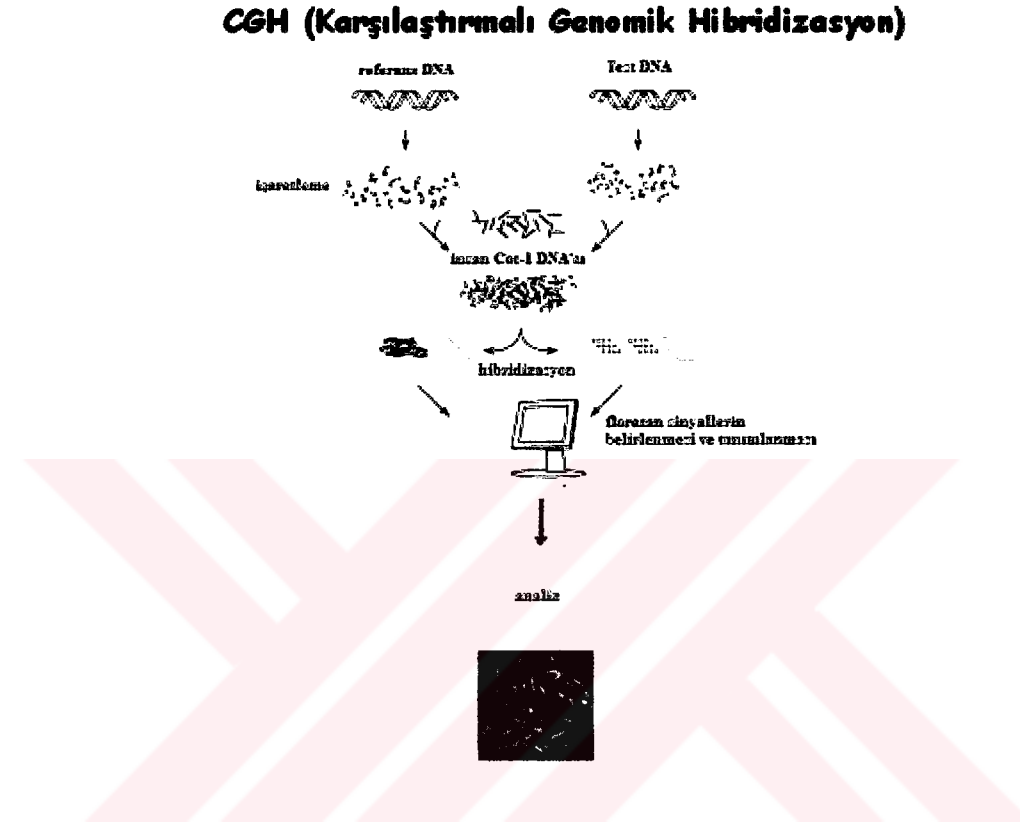
4-Optimizasyonu ve uygulaması zor bir tekniktir

5-Floresan mikroskobun bağlanabileceği bir bilgisayar sistemi ve programı gerekir. Bu nedenle pahalı bir tekniktir[50,51,55,92].

Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon tekniği ile hücre kültürü yapılmaksızın, çok az miktardaki materyalde dahi 5Mb ve üstü dengesiz genom anomalilerinin tanısı mümkündür. Son yıllarda bu yöntemin rezolüsyon gücünü arttıran programların . oluşturulması ile rezolüsyon gücü 2-3Mb'a kadar düşürülmüştür[29,34,70,89]. Yüksek rezolüsyonlu KGH yöntemi ve son dönemlerde rezolüsyon gücünü 1Mb'a kadar düşüren array-KGH çalışmaları yoğun olarak kullanılır hale gelmiştir[5,88,92].

Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon yönteminin uygulama basamakları Şekil 2.8'de belirtilmiştir. Bu yöntemde, genomu incelenmek istenen örnekten izole edilen DNA (test DNA) ile sağlıklı, normal birey DNA'sı (referans DNA) farklı florokrom moleküllerle işaretlenir. Genellikle test DNA yeşil rengi veren bir florokromla (Spectrum Green,FITC), referans DNA ise kırmızı rengi veren florokromla (Spectrum Red, Spectrum orange) işaretlenir. İki ayrı prob haline gelen örnekler,

kromozom kuruluğu normal olan bir metafaz preparatına hibridize edilir. Bu aşama iki renkli FISH aşaması ile aynıdır[12,24,29,34,50,59,66].



Şekil 2.8: Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon şekli

(http://www.istanbul.edu.tr/fen/mbg/english/nermin_g_ing_dosyalar/kromozom/ISH,FISH,GISH internet adresinden modifiye edilerek alınmıştır)

Hibridize olan test ve kontrol DNA dizileri aynı kromozom üzerindeki komplementer dizileri için bağlanma süresince rekabete girerler. Her bir kromozomal bölge için test DNA oranının referans DNA'ya oranı, o bölgedeki genetik materyalin az yada fazla bulunmasının bir ölçüm değeri verir[34,51,59,66]. Oranlar KGH'e spesifik bilgisayar programı tarafından değerlendirilerek normal KGH'de %95,yüksek rezolüsyonlu KGH'de ise %99.5 güven aralığı içerisinde normal, delesyon yada artış/Amplifikasyon bölgeleri profiller halinde ifade edilir[69,71]. Her KGH profilinde normal oranlarla gözlenen artma-azalma sınırları vardır. Bu sınırlar altında yada üstünde

olan floresan sinyal yoğunluğu sırasıyla delesyon ya da artış/Amplifikasyon olarak değerdendirilir[34,50,85].

Bu yöntem1990lı yılların ikinci yarısından itibaren özellikle kanser genetiğinde ve son yıllarda da klinik sitogenetikte yaygın olarak uygulanmaktadır. Bugüne kadar pek çok tümörde KGH analizleri ile tümöre spesifik bölgeler saptanmış ve bu bölgeler ileri moleküler analizler ile incelenerek, tümör oluşumunda etkili olabilecek aday genlerin idendifikasyonuna gidilmiştir[35,66,105].

Kolorektal kanserlerde kromozom 7,8q,13q,ve 20q artışları ile kromozom 8p ve 18q delesyonları KGH analizleri ile ortaya konmuştur ancak bu kromozomlar için yüksek rezolüsyonlu KGH verileri henüz yetersizdir. Yüksek rezolüsyonlu KGH normal KGH'a göre daha hassas olduğu içinde primer tümörlere spesifik anomali sıklığının artması beklenir.

Bugüne kadar kolorektal kanserlerin primer tümörlerindeki kromozom instabilite analizleri değerdendirilmiş olup son yıllarda bu tümörlerin metastazlarındaki anomalilerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Kolorektal kanserlerin karaciğer, lenf, akciğer vb gibi uzak bölge metastazlarına ilişkin bilgiler henüz yetersizdir. Bu nedenle; çalışmamızda primer kolorektal tümörler ile metastazlarında yüksek rezolüsyonlu KGH yöntemi ile genomik kopya aberasyonlarının belirlenmesi, metastaz oluşumunda etkili olabilecek mekanizma (ların) ortaya konmasında literatüre destekte bulunmayı amaçladık.

3.GEREC ve YÖNTEMLER

3.1. Gerek

3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri

Çalışmada histopatolojik olarak kolorektal karsinom tanısı almış bireylerden alınan primer tümör ve uzak bölge metastaz dokularının parafin kesitleri kullanılmıştır. Bu hastaların parafin kesitleri 2004 ve 2005 yılları arasında Haydarpaşa Eğitim ve Uygulama Hastanesi Patoloji Bölümü'nde histopatolojik incelemesi yapılarak Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na gönderilmiştir.

Çalışmamızda 25 olguya ilişkin 38 örnekten alınan parafin kesitlerde analiz gerçekleştirildi. Olgulara ilişkin yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, tümör sınıflandırması bilgilerine göre analizler arasında karşılaştırma yapıldı.

İncelemeye alınan 38 örnekten 25 tanesi primer tümör, 4 tanesi karaciğer metastazı, 8 tanesi lenf metastazı, 1 tanesi de over metastazıydı.

Primer tümörlerin Histopatolojik sınıflandırılmasında Aster-Coller (Modifiye Dukes sınıflandırması) sınıflandırılmasından yararlanıldı. Buna göre;

A evresi: Mukozaya lokalize tümör

B1 evresi: Lenf nodu metastazı olmadan muskularis propriaya kadar olan tümör tutulumu

B2 evresi: Lenf nodu metastazı olmadan muskularis propriayı invaze eden tümör

C1 evresi: Tüm barsak duvarı tutulumu ile beraber lenf nodu metastazı

C2 evresi: Barsak duvarını aşmış lezyon ile beraber lenf nodu metastazı

Çalışmaya dahil edilen tüm parafin dokulardan ve normal bir erkek bireye ait periferik kandan DNA ekstraksiyonu ve YR-KGH analizleri Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1.2. Kullanılan Araçlar

3.1.2.1. Kullanılan Aygıtlar

Bek	CCD Kamera (Photometrics)
Ben Mari (Heto-DT Hetoterm)	Deep-Freeze (Arçelik)
Binoküler araştırma mikroskobu (Olympus CH-2)	Elektronik Terazi (Seuter, Ainworth- AA-250, Setra-M2000L)
Buzdolabı (Arçelik 415)	Enjektör
Cam Kalem	Etüv (Friocell MMM Med Center)
Elmas Uçlu Kalem	Floresan mikroskop (Olympus)

Image Analyser (Applied Cytovision
3.1.)

Kronometre

Lamin Air Flow (Heraeus ELB2448)

Mikropipet (Eppendorf)

Mikrosantrifüj (Eppendorf Centrifuge
5415)pH Metre (Nel PH890)

Pipet Uçları (10'luk,200'lük ve
1000'lik)

Soğutmalı Santrifüj (Heraeus Biofuge
Stratos)

Termometre

Vortex (Janke and Kunkel, UF-2)

Zaman Ayarlı Santrifüj (Heraeus)

1,5 ml'lik ependorf tüpleri

Spin tüpleri (Qiagen)

Thermocycler (Techne)

15°C'lik Benmari (Polyscience)

3.1.2.2. Cam Malzeme

Beher (500 ml, 1000 ml)

Erlenmayer (500 ml, 1000 ml)

Lam

Lamel

Mezür

Santrifüj Tüpü

Yatay ve Dikey Şale

Cam pipet

3.1.3. Kimyasal Maddeler

Absolü Ethonol (Merck)

Antifade (Vector)

Chromosome Resolution Additive
(Genial GS)

DAPI (Sigma)

Democolcine Solution (Sigma)

Distile Su

Enjektörlük Bidistile su

Glacial acetic acid (Merck)

HC1 (Merck)

Immersiyon yağı (Merck)

KC1 (Merck)

KH ₂ PO ₄ (Merck)	Cot-1 DNA (Vysis)
Ksilol (Merck)	Spectrum Orange (Vysis)
Methanol (Merck)	Spectrum Gren (Vysis)
MgCl ₂ (Merck)	10xPcr Buffer (Sigma)
Na Citrat (Merck)	25mM MgCl ₂ (Sigma)
Na ₂ HPO ₄ (Merck)	50µM 6MW Primer
NaCl (Merck)	Taq Polimeraz (Sigma)
Formamid (Merck)	dATP (Vysis)
Nevparin (Mustafa Nevzat)	dCTP (Vysis)
Parafilm	dGTP (Vysis)
Phytohemagglutinin (Biochrom AG)	dTTP (Vysis)
Rubber Cement (Sanford 00491)	Nick translasyon Buffer (Vysis)
Tween 20 (Sigma)	Nick translasyon Enzim (Vysis)
Pepsin (Sigma)	DNase I(Sigma)
Na-asetat (Sigma)	Stop Buffer (Bio Nick)
ATL Buffer (Qiagen)	Etidium Bromide (Amresco)
Proteinaz K (Qiagen)	Tris(Sigma)
AL Buffer (Qiagen)	Borik asit(Sigma)
AW1 Buffer (Qiagen)	EDTA(Sigma)
AW2 Buffer (Qiagen)	Deiyonize formamid(Sigma)

Dekstran Sülfat

1000xRNase(Sigma)

Vecta-Shield(Vector Laboratory)



3.2. Yöntem

Histopatolojik değerlendirmede kolorektal kanser tanısı konulmuş dokulardan hazırlanan parafin doku örneklerinden alınan kesitlerden, tümör bölgesini içerdiği belirlenenler laboratuvarımıza iletilti. Bu örneklerden DNA elde edildi (test DNA). Sitogenetik olarak normal olduğu saptanan erkek bireylerden alınan periferik kandan da referans DNA elde edildi. Test ve referans DNA, Nick Translasyon işaretleme ve PCR işaretleme yöntemleri kullanılarak Spectrum Orange ve Spectrum Green florokromlarıyla işaretlendi. Sitogenetik olarak normal olduğu saptanan erkek bireylerden alınan periferik kandan ayrıca metafaz yayması yapıldı ve işaretli DNA'lar bu metafaz yaymasına hibridize edilerek yüksek rezolüsyonlu karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemi uygulandı. Metafaz plaklarının hazırlanmasında Henagaru ve ark.'nın [49] yöntemi kullanılırken KGH analizlerinde Kallioniemi ve ark.'nın [67] yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. Bu yöntemdeki aşamalar aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir.

1-Test DNA izolasyonu

2-Referans DNA izolasyonu

3-Test ve Referans DNA'ların amplifiye edilmesi

4-Test ve Referans DNA'ların floresan moleküllerle işaretlenmesi

5-Normal metafaz preparatlarının hazırlanması ve denatürasyonu

6-İki renkli FISH uygulaması

7-Hibridizasyon sonrası yıkamalar ve preparatların DAPI ile boyanması

8-Floresan mikroskopta inceleme

9-KGH profillerinin oluşturulması ve analiz

3.2.1. Test DNA İzolasyonu

Histopatolojik olarak karsinom tanısı olan primer tümör ve metastazları çalışmamızın test materyali grubunu oluşturdu. Parafin dokularda gerçekleştirilen 30 mikronluk kesitler, her biri farklı ependorf tüplerine koyularak ve üzerlerine protokol numaraları yazılarak Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na gönderildi. Anabilim Dalı Moleküler Sitogenetik laboratuvarına ulaşan örneklerde DNA izolasyon işlemleri gerçekleştirildi.

Parafin dokudan DNA eldesi QIAamp DNA Mini Kit içindeki ekstraksiyon protokolüne göre yapıldı.

- İçinde kesit bulunan ependorf tüpüne 1200µl ksilol eklendi ve hızlı devirde vortekslendi.
- Ependorf tüpü 5 dakika tam devirde santrifüj edildi.
- Pellete zarar vermeden süpernatant atıldı. Kalıntı ksilolü uzaklaştırmak için pellet üzerine süzölmüş %100'lük etanolden 1200µl konularak hafifçe vortekslendi.
- Ependorf tüpü 5 dakika tam devirde santrifüj edildi. Süpernatant atılarak bu işlem tekrar edildi.
- Atılabildiği kadar alkol uzaklaştırıldıktan sonra 37°C'lik etüvde 10-15 dakika alkolün tamamen uçması sağlandı.
- Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra üzerine Qiagen Buffer ATL koyulup pellet resüspande edildi. Yine üzerine 20µl Qiagen Proteinaz K solüsyonundan konularak vorteks yapıldı. 56°C'lik çalkalamalı su banyosunda dokunun parçalanma durumuna göre 1-3 saat arası inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyon sonrasında tüpün kapağına yapışan damlaları düşürmek için kısa bir santrifüj işlemi yapıldı.
- Santrifüj sonunda örneğin üzerine 200µl Qiagen buffer AL eklenip 15 saniye vorteks yapılarak 70 °C'lik su banyosunda 10 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda yine kapaktaki damlaların düşmesi için kısa bir santrifüj yapıldı ve süpernatant atılmadan üzerine 200µl %100'lük etanol koyulup 15 saniye vortekslendi. Karıştırma sonunda damlaların düşmesi için yine kısa bir santrifüj yapıldı.
- Karışım dikkatlice QiAamp spin tüpüne aktarılıp kapak kapatıldı ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Spin tüpü daha sonra 2ml'lik filtreli toplama tüpüne aktarıldı. Üzerine 500µl AW1 Buffer koyularak toplama tüpünün kapağı kapatıldı. 8000 rpm'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda toplama tüpü başka bir toplama tüpüne aktarılarak üzerine 500µl AW2 Buffer konulup kapak kapatılarak 1400 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldı.
- Sonra yeni bir toplama tüpüne aktarılıp 1400 rpm'de 1 dk daha santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpü içersindeki filtreli tüp 1,5ml'lik ependorf tüpüne konularak üzerine distile su konuldu ve 5 dk oda ısında bekletildikten sonra 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı.
- Ependorf tüpü içindeki örnek kullanıma kadar -20'de saklandı.

3.2.2. Referans DNA izolasyonu

Çalışmamızda sağlıklı, normal kromozom kuruluşuna sahip , erkek bireyden alınan periferik kandan DNA izolasyon işlemi gerçekleştirildi ve elde edilen DNA yöntemin referans DNA'sı olarak kullanıldı. Analizi yapılan tüm tümör örneklerinde aynı referans DNA kullanıldı.

Periferik kandan DNA eldesi QIAamp DNA Mini Kit içindeki ekstraksiyon protokolüne göre yapıldı.

- Su banyosu ısısının 56⁰C olduğu kontrol edildi.
- Kan örnekleri ve diğer malzemelerin oda sıcaklığında olduğu kontrol edildi.
- 1,5 ml ependorf tüpü üzerine uygun protokol numaraları yazıldı.
- 20µl Qiagen Proteaz (ya da proteinaz K) ependorf tüpünün dibine koyuldu.
- 200µl kan örneğinden ependorf tüpüne eklendi.
- Buffer AL kullanmadan önce çalkalandı ve 200µl örneğe eklendi. 15 saniye vortekslendi.
- ependorf tüpü içindeki örnek 56 ⁰C'de 10 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda ependorf tüpü kısa bir süre santrifüj edildi
- %96-100'lük etanolden 200µl örneğe eklendi. 15 saniye vortekslendi.
- Filtreli tüpün kapağına protokol numaraları yazılarak, ependorftaki karışım dikkatlice filtreli tüpe aktarıldı. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

-Filtreli tüp yeni toplama tüpüne konu. Filtreli tüp atıldı.

-500 l AW1 buffer dikkatlice filtreli tüpe konu. 8000 rpm’de 1 dk santrifüjlendi.

-Filtreli tüp ikinci bir yeni toplama tüpüne konu. Diğ r toplama tüpü atıldı.

-Filtreli tüp ikinci yeni toplama tüpüne konu ve üzerine 500 l Buffer AW2 konu. 14.000 rpm’de 3dk santrifüj edildi alttaki toplama tüpü atıldı.

-Filtreli t p ependorf tüpüne aktararak üstteki işlem tekrarlandı.

-Filtreli t p diğ r bir ependorf tüpüne aktararak üzerine 200 l distile su eklendi. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.

-Filtreli t p atılarak ependorf içindeki DNA -20’ye kaldırıldı.

3.2.3. Test ve Referans DNA’ların amplifiye edilmesi

Çalışmamızda parafin kesitlerden elde edilen DNA miktarının düşük olması nedeniyle test DNA’ları dejenere Oligonükleotid Primer- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (DOP-PCR) ile çoğaltıldı. Test ve referans DNA’lar arasındaki homojenliğı sağlamak amacıyla DOP-PCR işlemi referans DNA’lara da uygulandı.

3.2.3.1.DOP-PCR yöntemi

PCR’a başlamadan önce 10xPCR buffer, 25mM’lık MgCl₂, ve dATP, dCTP, dGTP ve dTTP ile hazırlanan 5mM’lık dNTP karışımı ve işleme koyulacak test ve referans DNA’lar oda ısısına getirildi. Aşağıdaki protokol izlendi.

- Soğutucu üzerine yerleştirilen küçük ependorf tüplerinin üzerine DNA'ların protokol numaraları yazıldı.
- Tüp içerisine aşağıdaki solüsyonlar konularak 50µl'lik bir çalışma solüsyonu hazırlandı.

10xPCR buffer	5µl
25mM MgCl ₂	4µl
5mM dNTPmix	2µl
50µM Primer(6MW)	4µl
Taq DNA polimeraz(5U)	0.5µl
DNA (test ya da referans)	5µl
Distile su	29,5µl

- Hazırlanan PCR reaksiyon tüpleri vakit geçirmeden PCR thermocycler cihazına konularak aşağıdaki programda DNA'ların amplifikasyonu yapıldı.

93°C'de	8 dakika	1 Döngü
93°C'de	1 dakika	5 Döngü
30 °C'de	1 dakika	
30 °C'den 70°C'ye	5 dakikada çıkacak	
72°C'de	1 dakika	

93°C'de	1 dakika	}	35 Döngü
56 °C'de	1 dakika		
72°C'de	2 dakika		
72°C'de	10 dakika	}	1 Döngü
+4 °C'de	∞ dakika		∞ Döngü

Amplifikasyon reaksiyonları tamamlandıktan sonra reaksiyon %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, amplifikasyon reaksiyonunu kontrolü yapıldı.

3.2.4. Test ve Referans DNA'ların floresan moleküllerle işaretlenmesi

Çalışmamızda test ve referans DNA'lar farklı florokrom moleküllerle işaretlendi. DNA'ların işaretlenmesinde Nick İşaretleme ve PCR işaretleme yöntemlerinin her ikisi de kullanıldı ve sonuçlar karşılaştırıldı.

3.2.4.1. Nick Translasyon İşaretleme Yöntemi

DOP-PCR ile amplifiye edilmiş DNA örneklerinin Nick Translasyon ile işaretlenmesinde Nick Translasyon kiti (Vysis) kullanıldı. Test ve referans DNA örnekleri aşağıdaki solüsyonlarla birlikte bir ependorf tüpü içerisine konularak 15 °C'ye getirilmiş su banyosunda 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu işlemde test DNA Spectrum Green ile referans DNA Spectrum Orange ile işaretlendi.

Nick Translasyon buffer(10X)	5µl
dNTP mix (0,1mM)	10µl
dTTP(0,1mM)	5µl
Spectrum Red/Spectrum Green(0,2mM)	3µl
Nick Translasyon enzim	10µl
DNA	5µl
Nükleaz içermeyen su	12,5µl

2 saat İnkübasyon sonunda ependorf tüpleri hemen buz kalıbı üzerine alınarak ya da -20'ye kaldırılarak reaksiyonun devam etmesi önlendi. İşaretli DNA uzunluklarının ölçülmesi için %1'lik jel hazırlanarak DNA'lar yüklendi. 30 dakika yürütülen jel, jel dökümantasyon sisteminde DNA fragment uzunluklarına bakıldı. Eğer fragmentler 700bp'den büyük ise DNase çalışma solüsyonu ile kesim yapıldı. Eğer fragmentler uygun uzunlukta ise işaretli DNA'ların Nick Translasyon reaksiyonu durdurulup DNA'lar birleştirilerek alkol presipitasyonu yapıldı.

3.2.4.1.1. DNase ile Kesim

Uzun fragmentleri olan DNA'lara 1:10 oranında DNase çalışma solüsyonu koyularak DNA fragment uzunluğuna göre belirlenen sürede (2-5 dk) oda ısısında kesim yapıldı. Kesim yapıldıktan sonra tüpler hemen soğutucu kalıp üzerine alındı ve fragment uzunlukları tekrar jelde değerlendirildi. İdeal fragment uzunluğuna ulaşan örneklerde Nick Translasyon işaretleme reaksiyon işlemi durduruldu.

3.2.4.1.2. Nick Translasyon Reaksiyonunun Durdurulması

Uygun aralıklarda olduğu kararlaştırılan işaretli DNA'lardaki reaksiyonu durdurmak için, rnekler 70⁰C'lik su banyosunda 10dk bekletildi[59].

3.2.4.2.PCR İşaretleme

Test ve referans DNA'ların florokrom moleküllerle işaretlenmesinde kullanılan diğer yöntemde test ve referans DNA rnekleri aşağıda belirtilen karışım içersine eklenerek DOP-PCR yöntemi uygulandı. PCR ile işaretlemede Henagaru ve ark.'nın uyguladığı method kullanılmıştır[52].

10xPCR buffer	5μl
25mM MgCl ₂	4μl
33.3mM dACGmix	0,4μl
50μM Primer(6MW)	4μl
Taq DNA polimeraz(5U)	0.5μl
dTTP (5mM)	1,5μl
dUTP (SO/SG)(mM)	2,5μl
DNA (test ya da referans)	xμl
Distile su	32.1-x μl

DOP-PCR koşulları

93°C'de	8 dakika	1 Döngü
93°C'de	1 dakika	} 35 Döngü
56°C'de	1 dakika	
72°C'de	2 dakika	
72°C'de	10 dakika	1 Döngü
+4 °C'de	∞ dakika	∞ Döngü

DOP-PCR sonrası, DNA fragment uzunluğunu değerlendirmek amacıyla PCR ürünleri %1'lik jelde yürütülerek değerlendirildi ve Nick İşaretleme aşamasında belirtilen DNase kesim işlemleri gereken DNA örneklerine uygulandı.

3.2.4.2.1.PCR işaretleme Reaksiyonunun Durdurulması

Reaksiyonun durdurulması için Nick işaretleme yönteminde kullanılan 70⁰C'de 10 dk ısıtma işlemi burada da yapıldı.

3.2.5. Presipitasyon

Reaksiyonu durdurulan DNA'lar aşağıdaki oranlarda tek bir tüp içerisinde birleştirilerek 1 gece -20'de bekletildi.

Spectrum Green ile işaretli Test DNA	25µl
Spectrum Red ile işaretli Referans DNA	25µl
Cot-1 DNA	30µl
3M Na-asetat	8µl
%100 Alkol	220µl

3.2.6. İşaretli DNA'nın Prob Haline Getirilmesi

- 1- Presipitasyon için -20'de bekletilen örnekler 30 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi.
- 2-Santrifüj sonunda süpernatant, işaretli DNA'ya zarar vermeden atıldı. Üzerine %70'lik soğuk alkol koyularak yeniden 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı.
- 3-Santrifüj sonunda alkolün tamamı atıldı ve arta kalan alkolün uzaklaşması için tüpler etüvde 20 dakika kadar kurumaya bırakıldı.
- 4-Kurutma işlemi yapıldıktan sonra üzerine 12µl hibridizasyon buffer konularak 30 dakika 45°C'deki su banyosunda probun çözünmesi sağlandı. 30 dakika boyunca arada bir tüpler hafifçe çalkalanarak prob çözünürlüğü değerlendirildi.
- 5-Probun hibridizasyon buffer içersinde tamamıyla çözünmesinden sonra tüpler çalışmaya alınıncaya kadar -20 °C'de bekletildi

3.2.6. Prob Denatürasyonu

Probun denatürasyonu için su banyosu önceden 73°C'ye ayarlandı. -20°C'den çıkan proplar 73 °C'deki su banyosunda 5 dakika denatüre edildi. Denatüre olan proplar 45 °C'deki su banyosunda 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda ise prob, denatüre edilmiş preparat ile hibridizasyona hazır hale geldi.

3.2.8. Preparatların Hazırlanması ve Denatürasyonu

3.2.8.1. Metafaz Preparatların Hazırlanması

Standart periferik kan kültürü sonrası elde edilen metafaz süspansiyonu, su buharında temiz lam üzerine yayılarak 5-20 saniye kadar su buharında bekletildi. Faz-kontrast mikroskopunda mitotik indeks, metafaz dağılım kalitesi ve kromozom morfolojisi değerlendirilerek KGH deneylerine en uygun preparatlar seçildi ve ön yıkamaya sokuldu.

3.2.8.1.1. Preparatların Ön yıkaması

- İyi metafaz bölgeleri belirlendikten sonra preparatlar 3 dakika 37°C'de su banyosunda 2XSSC'de çalkalandı.

- 2XSSC'den çıkan preparatlara RNase muamelesi yapıldı. Preparatlara, preparat başına 100µl RNase çalışma solüsyonundan konularak üstü bir lamelle kapatıldı ve distile su ile nemlendirilmiş kap içersinde 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 30 dakika sonunda preparat üzerindeki lamel dikkatlice düşürülerek preparatlar 37°C'de 2XSSC solüsyonunda 3 dakika çalkalandı.
- Preparatlar daha sonra 1XPBS solüsyonunda 3 dakika çalkandıktan sonra 37°C'deki pepsin solüsyonunda 5 dakika bekletildi. Pepsin içine %1 HCL preparatlar koyulmadan hemen önce eklendi.
- 5 dakika sonrasında pepsinden çıkan preparatlar 37°C'de 1XPBS solüsyonunda 3 dakika çalkalandı.
- 1XPBS'den çıkan preparatlar sırasıyla %70,%90,%100'lük alkollerden 2'şer dakika geçirildi. Alkollerden geçirilen preparatlar havada kurumaya bırakıldı.
- Preparatların kuruması tamamlandıktan sonra 73°C'de %70'lik Formamid/2 SSC solüsyonunda 2 dakika preparat denatürasyonu yapıldı.
- 2 dakika sonunda preparatlar hemen sırasıyla %70,%90,%100'lük soğuk alkollerden 2'şer dakika geçirilerek şoklama yapıldı. Alkollerden geçirilen preparatlar havada kurumaya bırakıldı.

3.2.9. İki renkli FISH

- Denatüre olmuş problemlerin bulunduğu ependorf tüpleri santrifüj edilerek tüm probun dibe çökmesi sağlandı.
- Denatüre edilen preparatlarda belirlenen alanlara prob (işaretli problemlerden 12µl) eklendi ve üzerlerine 24X24'lük kare lamel kapatıldı.

- Lamel çevresi su girmemesi için rubber sement ile yalıtıldı.
- Preparatlar 37 °C de iki gece formamidle nemlendirilmiş ortamda hibridizasyona bırakıldı.

3.2.10. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

Bu yıkamalarda spesifik olarak bağlanmayan prob DNA'larının ortamdan uzaklaştırılması ve metafaz DNA sına tam komplementer olan dizilerin hedef bölgede sabit hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Aşamaları:

- Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar etüvden çıkartılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi dikkatlice temizlendi.
- Preparatlar, oda ısısındaki 2XSSC solüsyonunda hafifçe karıştırılarak lamel düşürüldü
- Preparatlar 1XSSC solüsyonu ile 72 °C de 5 dakika inkübe edildi.

3.2.11. Preparatların DAPI ile Boyanması

- Prob DNA sının hibridize olduğu bölgelerin görünür hale getirilmesi için DAPI ile boyama işlemi gerçekleştirildi.
- 72°C den çıkan preparatlar DAPI/Antifade solüsyonu içersinde 3 dakika inkübe edildikten sonra 3 defa distile suda çalkalanarak kurumaya bırakıldı.
- Kuruyan preparatlara 25 µl yüzey boyası (vecta-shield) eklendi ve lamel ile kapatıldı. İnceleme aşamasına kadar – 20°C de ve karanlıkta bekletildi.

3.2.12.Preparatların Mikroskopta İncelenmesi ve Değerlendirme

Preparatlar Olympus Bx Floresan mikroskobunda Spectrum Green, Spectrum Red ve DAPI filtreleriyle incelendi. Patolojik olarak kolorektal lezyon saptanan hastalardan elde edilen dokulardan hazırlanan parafin doku kesitlerine uygulanan YR-KGH analizinde, her bir olgu için en az 10 metafaz plağı değerlendirildi. Floresan mikroskoba bağlı bilgisayar sistemi (Applied Cytovision 3.1) ile sinyaller değerlendirildi ve CCD kamera aracılığıyla floresan sinyalleri bulunan metafaz plakları YR-KGH programına aktarıldı. Daha sonra bu metafaz görüntüleri KGH programı aracılığıyla karyotiplendi ve her karyotipteki kopya aberasyonları YR-KGH profillerinde değerlendirilerek analizler gerçekleştirildi.

Her YR-KGH deneyinde kontrolü sağlamak için negatif kontrol olarak normal, referans DNA-referans DNA hibridizasyonu kullanıldı. Böylece yöntemin sensitivite ve spesifikliğı değerlendirildi.

3.3. Kullanılan Stok Solüsyonlar

Hipotonik Solüsyonu (0.075 M)

KCl	1.398 gr
Distile su	250 ml

Carnoy's Fiksatif Solüsyonu

Methanol	3 kısım
Glacial Acetic Acid	1 kısım

DOP-PCR Solüsyonları

DOP-PCR için dNTP mix hazırlanışı (5mM)

dATP	2,5 µl
dCTP	2,5 µl
dGTP	2,5 µl
dTTP	2,5 µl
Distile Su	40 µl

50µM Primer

Primer(200µM)	12,5 µl
Distile Su	37,5 µl

Nick Translasyon Solüsyonları

Nick Translasyon dNTP mix (0,1mM)

dATP	10 µl
dCTP	10 µl
dGTP	10 µl

Nick Translasyon dTTP (0,1mM)

dTTP	10 µl
Nükleaz içermeyen su	40 µl

Spectrum Red ve Spectrum Green (0.2mM)

Spectrum Red/Spectrum Green	4 µl
Nükleaz içermeyen su	16 µl

DNase Stok solüsyonu

DNase	3 mg
Distil Su	1 ml

DNase Çalışma Solüsyonu

DNase Sok Slüsyon	1 µl
1M MgCl ₂	8 µl
Soğuk Distile Su	400 µl

50XTAE Hazırlanışı

Tris(1M)	60,5 gr
Borik asit (1M)	30,85 gr
EDTA(20mM)	3,72 gr
Distile su	500ml

1XTAE Hazırlanışı

20XTAE	10 ml
Distile Su	490 ml

%1'lik TAE Jeli Hazırlanışı

Rutin agaroz	1 gr
--------------	------

1XTAE	100 ml
Etidium Bromide	5 µl

Preparatların Ön Yıkama Sölüsyonları

20XSSC Sölüsyonu

NaCl (3 M)	175,3 gr
Tri Sodyum Sitrat (0,3 M)	88,24 gr
Distile su	1000 ml
HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.	

2XSSC Sölüsyonu

20XSSC	20 ml
Distile su	180 ml
HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.	

RNAse Çalışma Sölüsyonu

1000XRNAse	1,1 µl
20XSSC	10 µl
Distile su	90 µl

10XPBS Sölüsyonu

NaCl	8gr
------	-----

KCl	2.01gr
KH ₂ PO ₄	11.36gr
Na ₂ HPO ₄	2.04gr
Distile Su	1 litre

HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.

1XPBS Solüsyonu

10XPBS	20 ml
Distile Su	180 ml

HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.

Pepsin Solüsyonu

Distile Su	100 ml
Pepsin(10mg/ml)	50 µl
HCl	1 ml

Preparatların Denatürasyon Solüsyonu

%70'lik Formamid

Formamid	70 ml
20XSSC	10 ml
Distile Su	20 ml

HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.

Hibridizasyon Sonrası Yıkama Solüsyonlar

2XSSC Solüsyonu

20XSSC	20 ml
Distile su	180 ml

1XSSC

20XSSC	5 ml
Distile Su	95 ml

Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.

Görüntüleme Sistemleri Solüsyonları

DAPI/Antifade Solüsyonu

2XSSC	45 ml
DAPI(0.2mg/ml)	18 µl

4. Bulgular

Kolorektal kanserli olgulardan alınan primer tümör ve metastazlarındaki genomik kopya aberasyonlarının yüksek rezolüsyonlu karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (YR-KGH) tekniği ile incelenmesinin amaçlandığı bu çalışmada toplam 38 parafin doku incelemeye alınmıştır.

İncelemeye alınan tümör dokusu örneklerinden 25 tanesi primer tümör, 4 tanesi karaciğer metastaz, 8 tanesi lenf metastazı, 1 tanesi over metastazı örnekleriydi. Çalışmaya alınan 25 primer tümörden 10 tanesinde hem primer tümör hem de metastaz gelişimi değerlendirilirken geri kalan 15 örnek sadece primer tümör dokusundandı.

Çalışmamızda primer tümör ve metastazları incelenen 25 olguya ilişkin örnekler hücre farklılaşması açısından gruplandırıldığında 2 tanesi iyi diferansiye, 18 tanesi orta diferansiye ve geri kalan 5 tanesi de kötü diferansiye idi.

Tümör örneklerinin incelendiği 25 olgunun 12 tanesi kadın, 13 tanesi erkek olup kadın/erkek oranı 0,92 olarak saptandı. Olguların yaş ortalaması 60.8 olup yaş aralığı 20 ile 90 arasında değişmekteydi. Kadınların yaş ortalaması 62.9, erkeklerin ise 58.8 idi.

Olguların tümör lokalizasyonları Çizelge 4.1’de görüleceği üzere 8 tanesi çekumda, 5 tanesi rektosigmoid bölgede, 6 tanesi rektumda, 6 tanesi de kolonda idi. Olguların Astler Coller’e göre yapılan evrelendirmesi de Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1: Çalışma Hastalarının Yaş, Cinsiyet, Histopatolojik Aşama, Tümör bölgesi, Tümör Çeşidi ve Astler-Coller Aşamasına Göre Özellikleri

Hasta	Yaş	Cinsiyet	Histopatolojik Evre	Tümör Bölgesi	Tümör çeşidi	Astler-Coller Aşaması
1	67	K	Kötü Diferansiye	Rektosigmoid	Primer tüm. +Kc+Lenf Met.	C2
2	78	E	Kötü Diferansiye	Çekum	Primer tüm. +Kc+Lenf Met.	C2
3	49	K	Kötü Diferansiye	Rektum	Primer tümör+Lenf+Over Met.	C2
4	48	E	Orta Diferansiye	Rektosigmoid	Primer Tümör+Kc Met.	C2
5	60	E	Orta Diferansiye	Rektum	Primer tüm. +Kc Met.	C2
6	61	K	Orta Diferansiye	Kolon	Primer Tüm. +Lenf Met.	C2
7	52	K	Orta Diferansiye	Kolon	Primer Tüm. +Lenf Met.	C2
8	87	E	Orta Diferansiye	Rektosigmoid	Primer Tüm. +Lenf Met.	C2
9	68	E	Orta Diferansiye	Kolon	Primer Tüm. +Lenf Met.	C2
10	66	E	Orta Diferansiye	Rektum	Primer Tüm. +Lenf Met.	C2
11	64	K	Kötü Diferansiye	Kolon	Primer Tümör	B2
12	38	E	İyi Diferansiye	Kolon	Primer tümör	B2
13	74	E	Orta Diferansiye	Çekum	Primer tümör	B2
14	57	E	Orta Diferansiye	Rektum	Primer tümör	B2
15	64	K	Orta Diferansiye	Çekum	Primer tümör	B2
16	90	K	Orta Diferansiye	Çekum	Primer tümör	B2
17	76	K	Orta Diferansiye	Rektum	Primer tümör	C2
18	73	K	Orta Diferansiye	Rektum	Primer tümör	B2
19	57	E	Orta Diferansiye	Çekum	Primer tümör	B1
20	60	K	Orta Diferansiye	Kolon	Primer tümör	B2
21	56	K	Orta Diferansiye	Çekum	Primer tümör	B1
22	50	E	Orta Diferansiye	Çekum	Primer tümör	B2
23	63	E	Orta Diferansiye	Rektosigmoid	Primer tümör	B2
24	20	E	Kötü Diferansiye	Çekum	Primer tümör	B2
25	42	K	İyi Diferansiye	Rektosigmoid	Primer tümör	B2

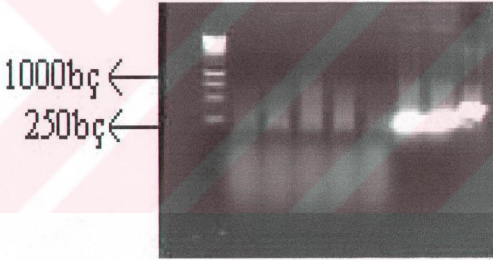
4.1.Yönteme İlişkin Bulgular

Başarılı bir YR-KGH uygulamasında etkili olan faktörlerden biri olan DNA konsantrasyonu çalışmamızda da etkisini gösterdi. Her tümör örneği için DNA izolasyonu 30 mikronluk parafin kesitlerde yapıldı. Elde edilen DNA miktarı spektrofotometre ile ölçüldüğünde 7-18 µg/ml arasında değişti ve bu miktar her iki DNA işaretleme yönteminin uygulanması için yetersizdi. Ayrıca Test/referans DNA hibridizasyonunda test DNA'nın homojen dağılımı gerçekleşemedi. Bu nedenle DNA örnekleri dejenere-oligonükleotid PCR (DOP-PCR) yöntemi ile amplifiye edildi. Tümör DNA' sına ilişkin tüm genomun amplifiye edilmesini sağlayan bu yöntemle örneklerin DNA miktarları 35-50 µg/ml olarak saptandı ve yöntemin uygulanması sonunda test DNA'nın hibridizasyon sonrası kromozomlarda homojen dağıldığı gözlemlendi. Bu nedenle tüm örnekler DOP-PCR ile çoğaltıldı.

Çalışmamızın ilk örneklerinde parafin dokudan elde edilen DNA materyalleri AE (10mM Tris-Cl; 0.5mM EDTA; pH:9.0) tampon solüsyonu içerisinde çözündürüldü. Ancak bu örneklerde gerçekleştirilen YR-KGH analizlerinde başarılı sonuç alınamadığından tümörlere ilişkin yeni parafinize doku kesitlerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildi ve DNA örnekleri distile su içerisinde çözündürüldü. Laboratuvarımızda DNA örneklerinin distile su içerisinde çözündürülmesi başarılı bir YR-KGH analizi için etkili bir parametre oldu.

Çalışmamızda tümör ve referans DNA' larının farklı florokrom moleküller ile işaretlenmesi aşamasında Nick transkripsiyon işaretleme yöntemi ile PCR işaretleme yöntemleri kullanılarak yöntemler arasında karşılaştırma yapıldı. Her iki yöntemde de DNA işaretleme aşamasında başarılı olundu. Laboratuvarımızda her iki yöntemin de benzer sonuçlar verdiği gözlemlendi.

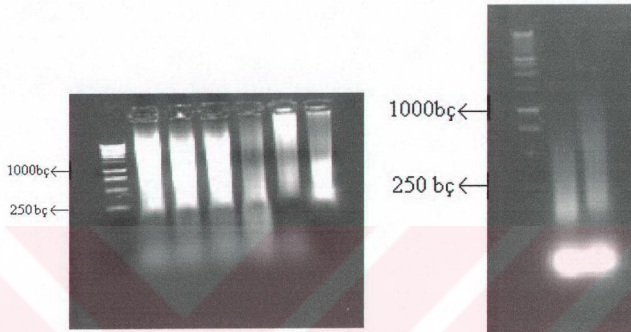
Başarılı bir KGH analizinde hibridizasyona sokulacak DNA fragment büyüklüğü en önemli etkenlerden biridir. Bu nedenle her iki işaretleme yönteminden sonra işaretlenen tümör ve referans DNA örnekleri %1 lik jel elektroforezinde yürütüldü ve fragment büyüklükleri değerlendirildi. Çalışmamızda en iyi sonuçlar DNA fragment büyüklüğünün 200-700 bç arasında olan örneklerden elde edildi (Resim 4.1). Yaklaşık 200 bç'den daha küçük DNA büyüklüğü olan örneklerde (Resim 4.2) hibridizasyon sonrası değerlendirmelerde metafaz kromozomları çevresinde spesifik olmayan floresan sinyaller gözlenirken, floresan sinyaller analiz için uygun değildi. DNA büyüklüğü 700bç'den den daha büyük olan örneklerde (Resim 4.2) ise hibridizasyon sonrası değerlendirmede herhangi bir floresan sinyal gözlenmedi. Bu nedenle bu örneklerde işaretleme işlemleri tekrarlandı ve DNase ile kesim yapılarak DNA büyüklüğü 200-700bç arasına getirildi.



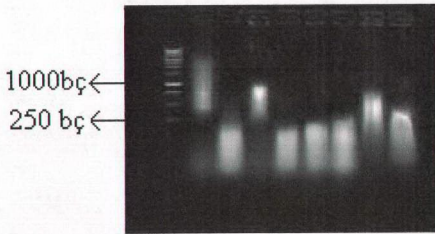
Resim 4.1.: Uygun Fragment uzunluğu

Yukarıda PCR işaretleme ile Nick transasyon yöntemleri arasında farklılık olmadığı belirtilmekle beraber bu iki yöntem DNA fragment büyüklükleri açısından farklılık gösterdi. Nick transasyon yönteminde işaretli DNA fragment uzunlukları homojen bir dağılım gösteriyordu. Fragmentler 200-700bç aralığındaydı ve bu nedenle DNase ile kesme işlemi 4 örnek dışında gerçekleştirilmedi. Ancak PCR ile işaretleme sonrası ürünler değerlendirildiğinde DNA fragment büyüklük aralığı 100-5000bç

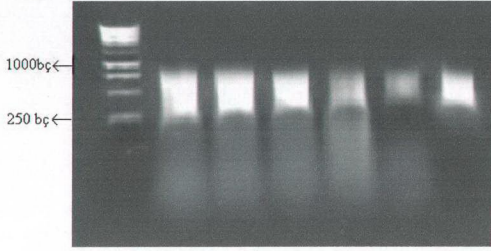
arasında değişmekteydi(Resim 4.3). Bu nedenle örneklerin büyük bölümünde PCR işaretleme sonrası DNase ile kesilme aşaması gerçekleştirildi(Resim 4.4).



Resim 4.2.: Sol tarafta 700bç'den büyük fragment uzunluğu
Sağ tarafta 200bç'den düşük fragment uzunluğu



Resim 4.3: PCR işaretleme sonrası farklı fragment boyutları



Resim 4.4.: Farklı boyutlardaki PCR İşaretlemenin kesim sonrasındaki görüntüsü

Diğer tüm moleküler sitogenetik yöntemlerde olduğu gibi başarılı bir YR-KGH çalışmasında da tümör ve referans DNA' nın hibridize edileceği metafaz preparatının kalitesi çok önemli bir faktördür. Bu nedenle sağlıklı ve normal erkek karyotipine sahip bireye ilişkin metafaz kromozom preparatlarının hazırlanmasında Henegariu ve ark.[45] tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Bu yöntemde su buharı üzerinde metafaz solüsyonu lamın belirli yerlerine yaklaşık 30 cm yukarıdan dikkatlice damlatılarak preparat su buharına tutuldu ve böylece kromozomların yayılması sağlandı. Her bir preparat hazırlama işleminden sonra faz-kontrast mikroskopta preparatlar, mitotik indeks, kromozom morfolojisi ve metafaz içindeki kromozomların birbirleriyle yakınlıkları değerlendirildi. En kaliteli preparatlar hibridizasyon için ayrıldı. Böylece mikroskop analizi sırasında metafazlardaki her kromozom başarıyla değerlendirildi. Preparat kalitesi düşük olduğunda zeminde yoğun spesifik olmayan sinyal birikimi, homojen olmayan, nokta nokta dağılım gösteren floresan sinyaller gözlemlendi. Ayrıca üst üste gelen kromozomlar incelemeyi engelledi.

4.2.Tümör Örneklerine İlişkin Bulgular

Yaptığımız çalışmada primer tümörler ve metastazlar,hem kendi içlerinde hem de olgu grupları arasında karşılaştırmaları yapılarak sonuçlar değerlendirildi. Tüm örneklerde (primer tümör ve metastazlarda) kromozom ya da kromozom bölge artış/amplifikasyonu, kayıplara göre daha yüksek sıklıkta gözlemlendi (artış/amplifikasyon:12.7/tümör, eksilme:2.7/tümör). İncelemelerde özellikle karaciğer metastazı olan olguların tüm kromozomlarında değişim gözlenirken primer tümörlerde tümörün histolojik aşamasına bağlı olarak kopya sayı değişim sıklıkları farklılık gösterdi.

4.2.1.Primer Tümörlerdeki Anomaliler

Primer tümörlerde, toplam 25 örnekte 411 anomali saptandı ve anomali oranı 16.4/tümör olarak gözlemlendi. Örnekler arasında 2 tane iyi diferansiye, 18 orta diferansiye ve 5 kötü diferansiye örnek vardı ve sellüler diferansiye oranı azaldıkça genomik kopya anomalisinin arttığı gözlemlendi. Anomali oranı iyi diferansiye örneklerde 6.0/tümör iken, orta diferansiye örneklerde 14.8/tümör ve kötü diferansiye örneklerde ise 26.2/tümör olarak hesaplandı.

Primer tümörlerde en sık gözlenen kromozom bölge artış/amplifikasyonları görülme sıklıklarına göre 7q(20/25), 8q(20/25), 20q(20/25), 13q(19/25), 20p(15/25), 7p(14/25), 19p(14/25), 2q(10/25), 3q(10/25), 19q(10/25), 1q(9/25), 2p(9/25), 6q(9/25), 10q(9/25), 11p(9/25), 12q(9/25), 14q(9/25), 1p(8/25), 6p(8/25), 15q(8/25), 3p(7/25), 4q(7/25), 11q(7/25), 16q(6/25) iken, en sık görülen kayıplar 18q(14/25), 8p(8/25), 17p(7/25), 18p(7/25), 4q(4/25) ve 22q(4/25) idi.

Primer tümörlerin iyi, orta ve kötü diferansiye olarak ayrılan örneklerinde karşılaştırma yapıldığında iyi diferansiye örneklerde anomali sıklığı düşüktü. Bunun aksine orta ve kötü diferansiye örneklerde anomali oranı hem çok yüksek hem de birbirine benzer rastgele olmayan anomalilerdi (orta diferansiye:14.8/tümör ve kötü diferansiye: 26.2/tümör). Buna göre bir değerlendirme yapıldığında bu üç aşamadaki olgularda 3q, 7q, 7p, 8q, 10q, 12q, 13q, 20p ve 20q, artışları sık gözlenen ortak anomaliler oldu. Bununla birlikte orta ve kötü diferansiye aşamasındaki örneklerde birbirinden farklı kromozom artış bölgelerine rastlanmadı sadece bu kromozom artışlarının sıklıklarında farklılık gözlemlendi. Orta diferansiye örneklerde 20q(12/18), 8q(10/18), 1p(8/18), 7q(8/18), 2q(7/18), 1q, 3q, 6q, 14q, 20p(6/18), 2p, 5q, 10q, 19q(5/18) en sık görülen kazançlar olmasına rağmen bu kromozomların kötü diferansiye örneklerde [2p, 8q, 20p(5/5), 2q, 7q, 10q, 13q, 19q, 20q(4/5), 1p, 1q, 3q, 5q, 6q, 14q(3/5)] oranları daha yüksekti. Bunların yanında kötü diferansiye örneklerde 19p, 15q(4/5), 1q, 3p, 5p, 6p, 12q(3/5) de orta diferansiye örneklerden daha yüksek bulunan diğer kromozomlardı. Örnekler kayıplar açısından değerlendirildiğinde iyi, orta ve kötü diferansiye örneklerde 8p ve 18q21 kayıpları ortak gözlenen delesyonlar olurken, kötü diferansiye örneklerde 8p, 18q kaybının yanında 17p delesyonu da sık görülen değişim oldu.

Metastazı olan ve metastazı olmayan primer tümörlerde bir karşılaştırma yaptığımızda da ortak görülen anomaliler 3,7,8q,13q ve 20 kazançları ile 8p ve 18q kayıpları oldu. Bununla birlikte 17p kaybı sadece metastazı olmayan primer tümörlerinde görülürken 6q(9/10), 14q(9/10), 4q(7/10), 11q(7/10), 16q(6/10), 1q(5/10), 3p(5/10), kazançları ile 22q(4/10) kaybı sadece metastazı olan primer tümörlerde görüldü. Bunlar dışında bir diğer fark metastazı olmayan örneklerde görülen anomali yüzdeleri metastazlı primer tümör olgularından daha düşük orandaydı (metastazlı primer tümörlerde 22.2/tümör; metastazı olmayan primer tümörlerde 12.6/tümör).

Çalıştığımız dokuların histopatolojik değerlendirmesi için kullanılan Aster-Coller sınıflandırmasına göre olgularımız arasında 2 tane B1, 12 tane B2, 11 tane de C2

aşamasında primer tümör bulunmaktaydı. Bunlarda yapılan karşılaştırmalarda ise bir üst paragrafta değindiğimiz metastazlı ve metastazı olmayan primer tümör karşılaştırmasında bulduğumuz sonuçlara benzer sonuçlar gözlemlendi. Buna göre B1’de sadece 7p, 7q, 13q ve 20q kazancı görülürken B2 ve C2’de bu kromozomlar haricinde 8q, 20q, 3p, 3q ortak görülen kazançlar olurken 18q ve 8p’de ortak görülen kayıplar oldu. Bunun yanında, 1q, 3p, 4q, 6q, 11q, 14q ve 16q, kazancı ile 22q kaybı sadece C2 aşamasında görüldü.

4.2.2. Metastaz Örneklerdeki Anomaliler

Çalışmaya dahil edilen metastatik örnekler birlikte değerlendirildiğinde genomik kopya değişim oranı 17.2/tümör olarak saptandı.

Tümörlerin karaciğer metastazlarında gözlenen anomali oranı 19.7/tümör iken bu örneklerde de kromozom artış/Amplifikasyon sıklığı (16.7/tümör) delesyona (3/tümör) göre daha fazlaydı.

Karaciğer metastazlarında en çok görülen genomik kopya artışları kromozom 1q(4/4), 7p(4/4), 8q(4/4), 11p(4/4), 13q(4/4), 16p(4/4), 5p(3/4), 7q(3/4), 12q(3/4), 17q(3/4), 19p(3/4), 19q(3/4), 20q(3/4), 6q(2/4), 9q(2/4), 12p(2/4), 15q(2/4), 16q(2/4), iken delesyonlar kromozom 5q(3/4), 18q(3/4) ve 8p(2/4) de gözlenmiştir.

Tümörlerin lenf metastazlarında görülen anomali oranı 9.2/tümör olurken bu örneklerde de karaciğer metastazlarında olduğu gibi artış/amplifikasyon sıklığı (6,6/tümör) kayıplara (2.6/tümör) göre daha fazlaydı.

Tümörlerin lenf nodu metastazlarında en çok görülen kopya artışları 6q(5/8), 7q(5/8), 20q(5/8), 3q(4/8), 5q(4/8), 8q(4/8), 13q(4/8), 2q(3/8), 3p(2/8), 7p(3/8) 10p(3/8), iken, kopya delesyonları ise 18q(7/8), 8p(5/8), 4q(4/8) idi.

İncelenen lenf nodu metastazlarından 3 tanesi kötü diferansiye, 5 tanesi orta diferansiye örneklerdi ve her iki gruptaki örneklerde kromozom 2q, 3q, 5q, 6q, 7q, 8q, 13q, 20q genomik kopya artışı ortak anomali olarak saptanırken 3p, 7p, 10p kazançları sadece kötü diferansiye örneklerde görüldü. Bununla birlikte 16q kazancı da sadece orta diferansiye örneklerde bulundu.

Metastaz olgularında ve primer tümörlerde bir karşılaştırma yaptığımızda, 9q, 12p kazancı sadece karaciğer metastazlarında görülürken, 10p kazancı sadece lenf nodu metastazlarında 4q, 10q, 14q ve 20p kazançlarında sadece primer tümör olgularında görülmüştür.

Yaptığımız çalışmada bir tane de over metastazı olan bir olgumuz vardı. Bu olguda 1p, 1q, 2, 3, 5, 6, 8q, 9p, 10q, 13q, 18q, 20, 21q kazançları ile 1p36, 16p13, 18q, 22q, kayıpları bulundu

Çalışmaya dahil edilen olgulardaki tüm kopya sayı değişimleri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Ayrıca metafaz prob görüntüsü, kontrol, primer tümör, karaciğer metastazı, lenf metastazı örneklerine ilişkin KGH analizleri ve profillerinin resimleri sırasıyla Resim 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.2: Çalışmaya dahil olan örneklerde gözlenen genomik kopya değişimleri

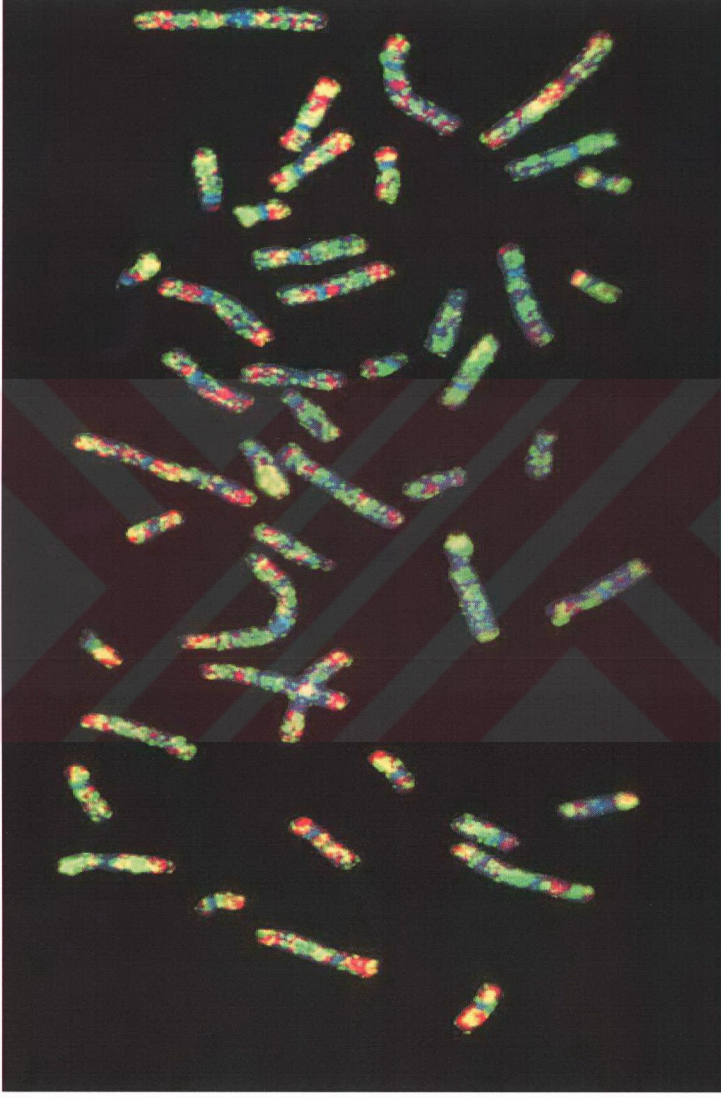
Hasta no	Primer tümör	Kc metastazi	Lenf metastazi	Over metastazi		
	kayıp	kazanç	kayıp	kazanç		
1	8p, 18p, 18q12-q23	1p22-p13.2, 1q21-qter, 2p21-p11.2, 2q12, 2q22-3-q37, 3p24, 3p13-p12.2, 3q12-q21, 3q25-q25.2, 4q, 5p, 5q, 6p24, 6p21.2-p11.1, 6q, 7p, 7q, 8q, 10q11.2-q22, 11p13-p11.2, 11p15.4, 11q14.3-q22.3, 12q12-q22, 13q, 14q24, 15q15-q23, 15q26, 16q13-q23, 19p, 19q13.1, 20p13-p11.1, 20q	8p, 17p12, 18q,	kazanç 1p36, 1q, 5p13.2, 6q16.3-q22.2, 7pter-p21.2, 7q11.2-3, 7q36.3, 8q11.2, 8q13.2, 11pter-p15.3, 13q21.3, 15q15-q21.1, 16p11.2, 17q21.2, 19p, 19q12-q13.12, 20q,	kayıp 4q, 8p, 18q,	kazanç 3q13.3-qter, 5p14.1, 5q12.3-q15, 5q21.3-qter, 6q14, 6q24, 7p, 7q11.2-q21.3, 7q31.3-q36.3, 8q, 13q14.1-q31.3, 13q34, 20q
	8p, 9q21.1, 18q, 22q12	1p31.3-p13.2, 1q24-q42, 2p22-p12, 2q14.3, 2q21-q37, 3p25-p21.33, 3p14-p12.2, 3q12-q21.3, 3q24-q27.2, 4q, 5p15.2-p13.2, 5q11.2-q31.2, 6p23, 6p12, 6q12-q25, 7pter-p15.2, 7p14-p11.2, 7q11-q35, 8q11.2-q24.2, 10q11.22-q26, 11p15.4-p11.2, 11q13.5-q23, 12q13.13-q23, 13q14.12-q33.2, 14q12-q23, 14q24-q32, 15q21, 15q22.3-q26.2, 16q21-24, 19p, 19q13.11, 20p12, 20q	5q14.1-q21.3, 8p23.1-p11.2, 18q12.3-q23	kayıp 1pter-p33, 1p22.2-p13.2, 1q, 2p25, 2q13, 2q21.1, 6q12-q24.2, 7p, 7q11.2-q21.3, 7q31.3-qter, 8q, 9q22.3-q31.3, 9q34, 11p15, 11q13.1q14.3, 12p, 12q12-q13.3, 12q21.1-q24.2, 13q14.1-q32.3, 15q12-q21.3, 15q22.3-q26.1, 16p13.2-p11.2, 16q21-qter, 17q21.3-qter, 19q, 20q	kayıp 18q, 8p, 4q	kazanç 2q22-q36, 3p24-p21, 3p14-p12.2, 3q, 5q, 6q12-q25, 7p, 7q, 8q11.2-q24.12, 10p12-p11.2, 13q12.12, 13q13-q34, 20q11.22,
2						
3	18q, 22q12	1q21-q25, 2p, 2q, 3p13-p24, 3q13-q26.3, 6p21, 6q,		8p, 18q, 20p12, 2q22-q35, 3p22, 5q33, 7q,	1p36, 16p13.2, 18q21, 22q, 1p34.1-p22, 1q32, 2p, 2q22-q37,	

4	18q21.2, Yp11.3-q12	7q22-q35, 8q23-q24, 11p14, 12q, 14q, 20p	5q21-q31, 9p, 21q11.2	1q22-q44, 7p21.3, 8q12.3, 8q21.2-q24.1, 9q32-qter, 11p14, 12p12, 12q22-q24.2, 13q12-q14.2, 13q22, 16p12, 16q21-q23, 17q22, 20q11.2,		10p12.1, 13q13-q34, 20q	5p13-p24, 3q12-q27, 5q11.2-q22, 5q31.1, 6p21.1-p11.1, 6q, 8q21-qter, 9p21, 10q21.3-q23, 13q21.1, 13q22, 13q31, 18q22, 20p11.2, 20q11.2, 21q22.1
5	4q, 6q26, 9q21, 18q	1p31.1-p13., 1q32-q44, 2q11.2, 3p14.3q25.1, 4q13.1, 6q26, 7q21.1, 8q23, 11q22.3, 13q21, 14q13-q31, 16q23, 19q, 20q, Xp22.1, Xq22,	5q21, 8p, 18q,	1q, 5p14.1-p13.2, 7q, 8q23-qter, 11p, 12q22-qter, 13q12-q21, 16p11.2-p13, 19p, 19q			
6	2q21, 7q32, 8p, 22q12.3-q13.1	1q33-q43, 3q, 6q24, 7q22-35, 8q24, 10q11.2, 11p12, 11q14, 14q24, 16q21, 17q23, 20q			8p, 18q,	2q21, 2q36, 3q13, 5q14-q32, 6q22-q24, 13q14, 16q21	
7	22q	1q43, 3q, 6q26, 7q22, 7q31, 8q22, 11q, 14q24-q32, 16q23-qter			1p36.3, 15q23-q25,	7q32, 10p12	
8	18p	1q22.2, 2p12, 3q, 4q, 6q16, 6q24.3, 8q21.1, 8q23.3, 11q, 14q21-q31, 19p, 19q, 20p12			3p24.3, 18q	5q15, 5q21.1, 20q11-q12	

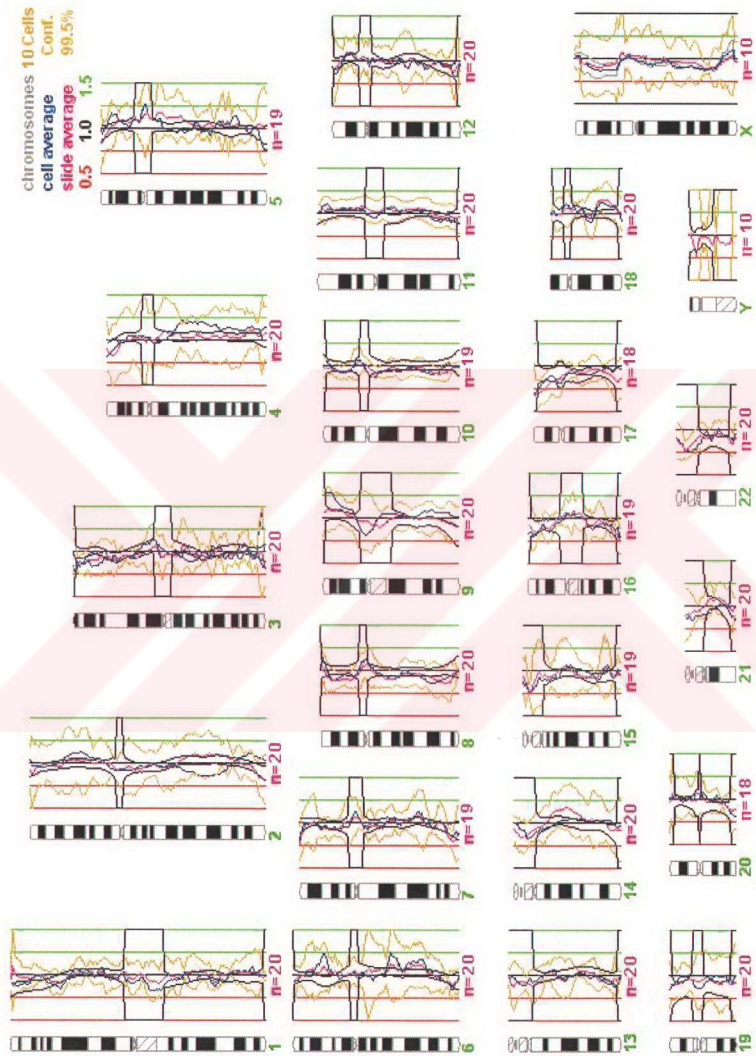
9	6q25, 18q, 8p	1p32-p36, 2p24, 2q21, 3q13-q25, 4q, 7p15-p11.2, 7q33, 11p12, 12q21.3, 13q21-q32, 14q, 15q13-q15, 16p13.1, 17q11.2, 19p, 20p11-12, 20q11.2			2q36-qter, 4q, 8p, 18q22	3q12-q26, 6q21, 7q21-q36, 8q23-q24, 20q11.2		
10	4q, 8p, 18q	1p31, 2p16, 2p14, 2q32, 3p21.3, 3p13, 3q13.3, 3q23-q26.2, 4q32.2-q35, 5p14.2-p13.2, 5q13.2-q22, 5q31.2, 5q33.2, 5q35.3, 5q37.2, 6q21.1, 6q24-p22.2, 6q21.1, 6q13-q25.2, 7p21-pter, 7q34-qter, 8q13.2-q21.3, 8q24-qter, 10q26.1, 13q12, 13q13, 13q31, 13q34, 17q11.1, 17q21.2, 19p, 20q, 20p11.2-12			4q, 8p, 18q	3q24, 6q25-q27, 8q23-qter		
11	8p, 17p, 18p, 18q	1pter-p22, 1p21.2p13.2, 2p25.1-p22, 2p14-p12, 2q21-q37, 5pter-p13, 5q13.1-q32, 5q35.1-qter, 6p, 7p, 7q, 8q21.1, 8q23-qter, 10q11p, 12q21.2-q24.3, 13q12-q22, 13q24, 15q25, 17q, 19p, 19q, 20p12.1-p11.1, 20q, Xp22.3, Xq27.3-qter, Yq11.2						
12	bulunamadi	2q32.1, 7p21, 7q31-qter, 8q21-qter, 10q11.2-q21.3, 12q15, 13q32, 13q14-q32, 20p, 20q						
13	1p36, Xq26-qter 8p, 17p, 18q	1pter-q31, 2p24, 5p14.1, 5q21, 6p12, 7p12,						

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

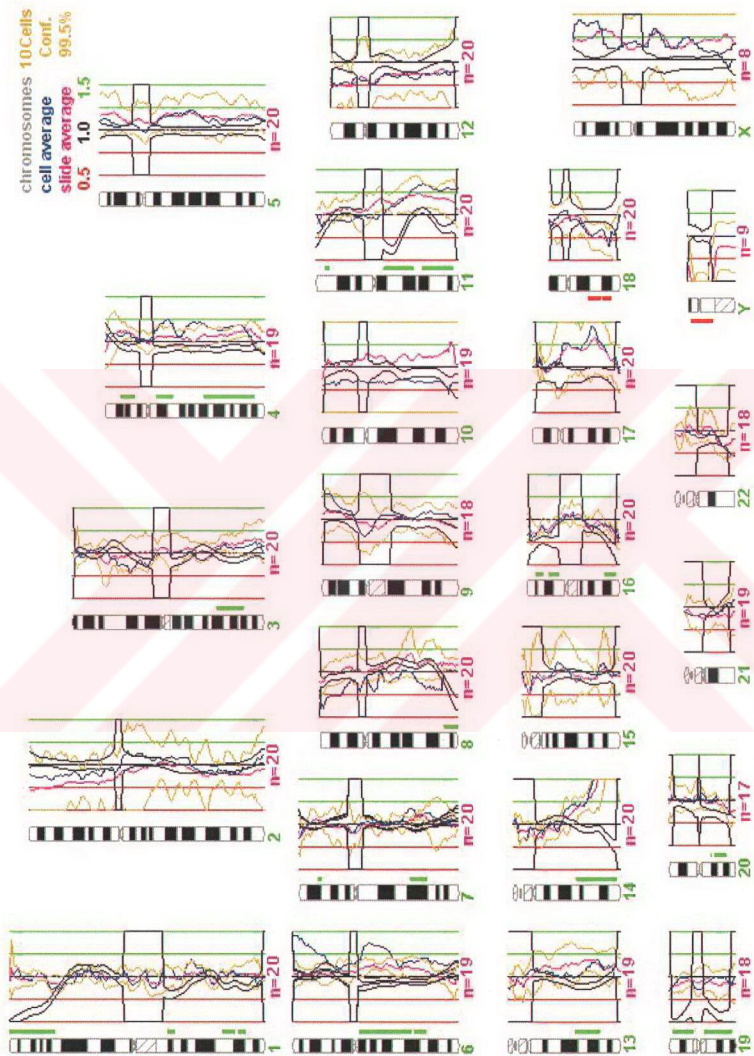
22	3p21, 3p13, 5p15.3, 5q-33, 8q22.3, 18p11.3, 18q21, 21q21, 20p12	1p34.1, 7p21, 8q24, 13q21-q33, 20q							
23	2p13, 12q21.3	7q22-35, 8q24, 20q12, 20p12-p13							
24	17p, 18q	2p, 7q21, 8q23-qter, 10q11.2-q22, 13q14-q33, 15q23-qter, 19p, 19q, 20p11.2-pter, 20q							
25	Bulanmadi	13q21.2, 20q							



Resim 4.5.: 1. olguya ait metafaz probe görüntüsü



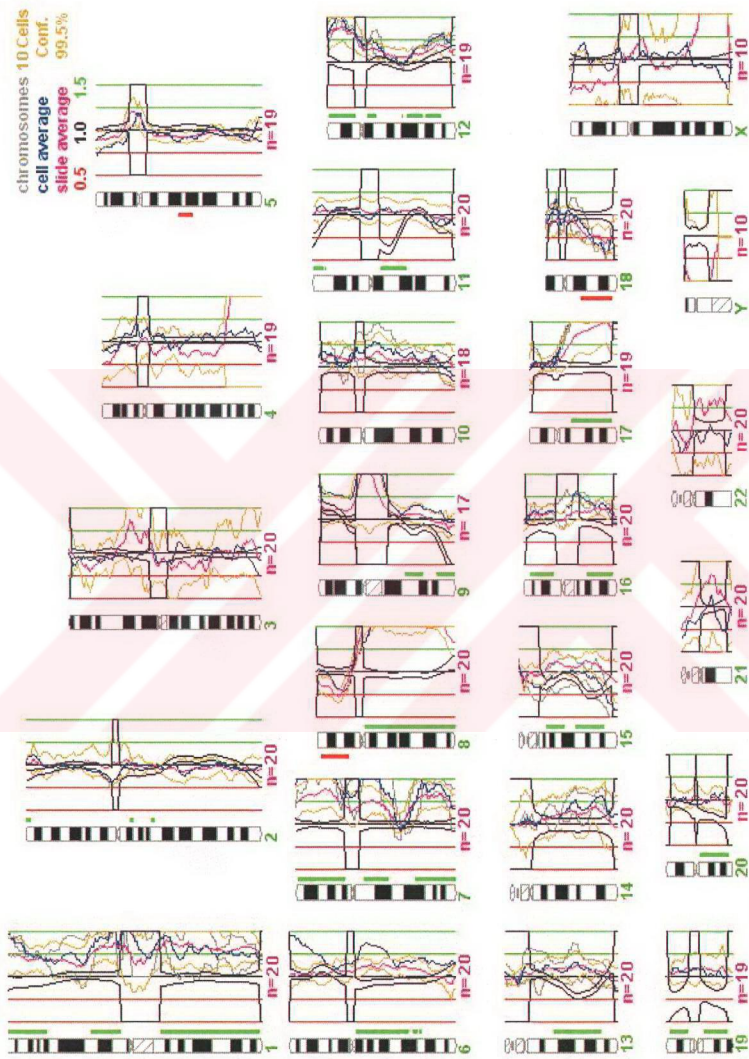
Resim4.6: . Kontrolde ait KGH analiz görüntüsü



Resim4.7: 4. olguya ait primer tümör KGH görüntüsü



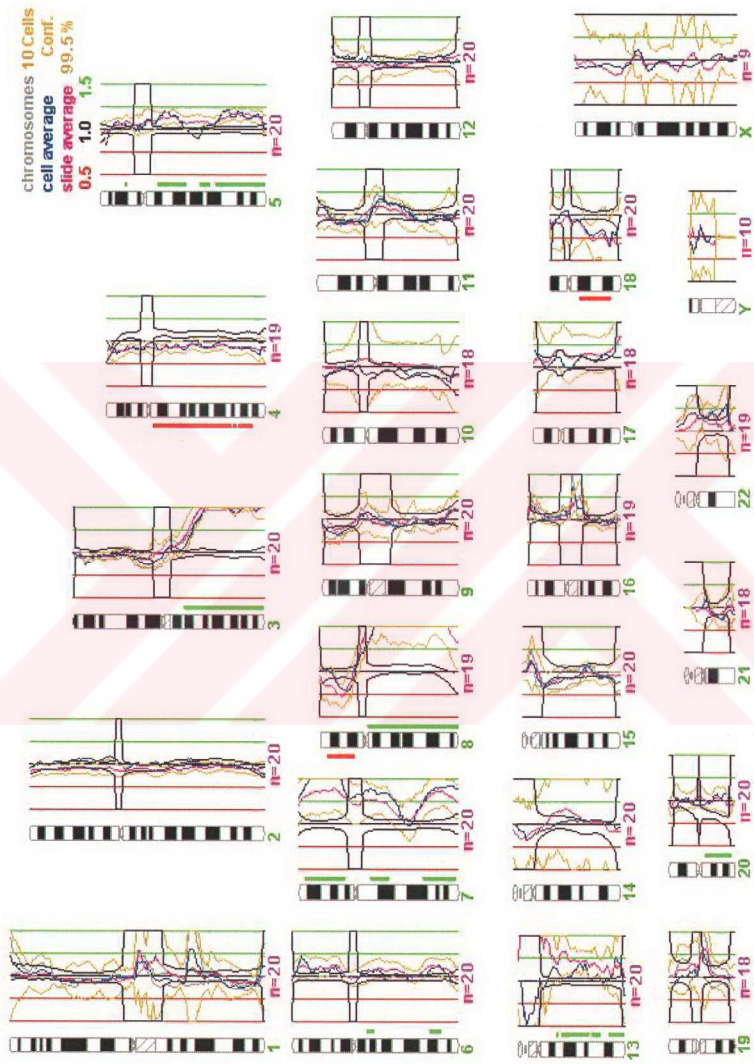
Resim4.8: primer tümörlere ait profil görüntüsü



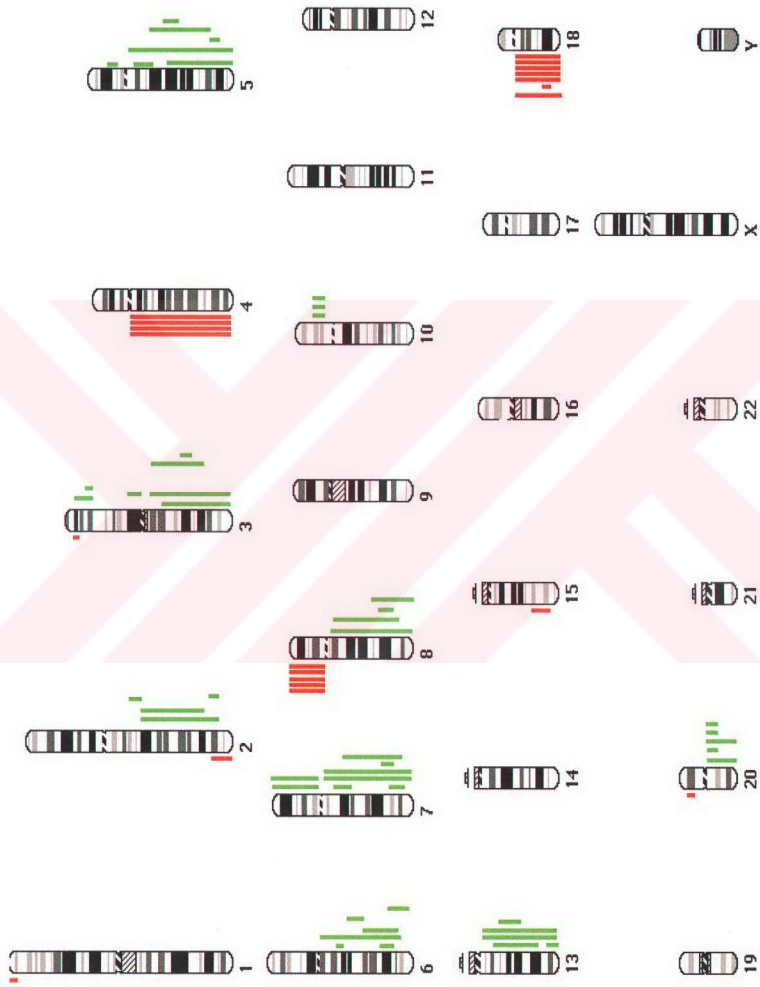
Resim4.9: 2. olgunun karaciğer metastazına ait KGH



Resim4.10.: Karaciğer metastazlarına ait profil görüntüsü



Resim 4.11.: 1. olgunun lenf metastazına ait KGH analiz görüntüsü



5.TARTIŞMA

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (KGH) dengesiz genetik değişimleri tanımlayan bir moleküler sitogenetik yöntemidir. Temeli iki renkli FISH tekniğine dayanan bu yöntemde tüm kromozomlardaki genomik kopya artış yada eksilmelerinin detaylı olarak analiz edilmesi ve dengesiz kopya sayısı bulunan kromozom bölgelerinin saptanması hedeflenmektedir. Bu yöntemin çeşitli üstünlükleri vardır: 1- Tek bir hibridizasyonla total genomun analizi yapılabilmekte, 2-Bu analiz için canlı hücreye gereksinim duymamakta ve 3- Çok az miktardaki örnekte dahi analiz yapılabilmektedir[85,98]. Bu özellikler sadece KGH da bulunmaktadır. Çünkü spesifik gen testleri sekanslama analizleri, FISH analizleri gibi diğer DNA- temelli yöntemlerde sadece hedeflenen bölgenin analizi yapılabilir. Bu özellikleri nedeniyle KGH başta tümör genetiği olmak üzere farklı alanlarda kullanılan bir yöntemdir[39,89].

Yapısal kromozom anomalilerinin incelenmesinde, sitogenetik ve klasik KGH analiz yöntemleri arasında bir benzerlik bulunmaktaydı. Sitogenetik analizlerin anomalileri saptama duyarlılığı ile KGH'in duyarlılığı benzer oranlardaydı (>5Mb) ve ayrıca KGH da dengeli anomalilerin tanısı konamıyordu. Bu nedenle KGH, tümör genetiğindeki avantajlarına rağmen klinik sitogenetikte genellikle sitogenetik analizlerle tanısı konmuş anomalileri doğrulamak amacıyla kullanılıyordu[16,108]. Ancak son dönemlerde,KGH verilerinin sabit aralıklar yerine dinamik standart referanslar kullanılarak değerlendirilmesine dayanan yüksek rezolüsyonlu-KGH'nin gelişmesi ile rezolüsyon gücü 2-3 kat artarak 3Mb'a kadar ulaştı. Dolayısıyla dengeli olduğu düşünülen ancak 3-5Mb arasında dengesiz özellik gösteren anomalilerin de tanısı artık YR-KGH ile mümkün olmaktadır[89].

Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyonun (KGH) yukarıda belirtilen avantajlarının yanında yöntemin zor olması, optimizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesinin zorunlu olması, yöntemin her aşamasında optimum koşulların

sağlanması zorunluluğunun bulunması ve kesinlikle bir sistemle birlikte analizin gerçekleştirilmesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır[30,34,51,85].

Başarılı bir KGH deneyinde aşağıdaki parametreler çok önemlidir.

- 1- Kontrol ve test DNA'sı eşit konsantrasyonda olmalı,
- 2- Sadece çok iyi yayılmış, mümkün olduğunca hiç üst üste gelmemiş kromozomları bulunan metafazlar kullanılmalı,
- 3- Yüzeydeki spesifik sinyal oranının minimum olması için preparatı sitoplazma artıklarından çok iyi temizlenmeli,
- 4- Kromozomların denaturasyonu optimal olmalı (aşırı denatüre yada az denatüre olmuş kromozomlarda floresan sinyal fenotipi analize izin vermez),
- 5- DNA fragmentlerinin büyüklüğü 200-1200bp arasında olmalı[31].

Yukarıda maddeler halinde belirtilen parametrelerin önemi çalışmamızda da desteklenmiştir. Parafinize dokulardan elde edilen test DNA miktarı ve kalitesi düşük olduğundan her iki işaretleme yönteminin uygulanmasını engellediği gibi hibridizasyon sırasında da homojen bir dağılım gösterememiştir. Bu nedenle tümör DNAları DOP-PCR ile amplifiye edilmiştir. Diğer taraftan formalinde fikse edilmiş ve parafine gömülmüş örneklerin DNAsında azalma/kayıp/küçülme olabileceği bunun da KGH'da aşırı granüllü ve düşük yoğunlukta floresan sinyal oluşumuna neden olabileceği ifade edilmektedir[61,62,78]. Bu nedenle çalışmamızda DOP-PCR ile amplifikasyon işlemleri uygulanarak hem DNA miktarı arttırıldı hem de test ve referans DNAların homojen özellik kazanması sağlandı.

Çalışmamızın yöntem aşamasında yaşanan diğer problem, DNA fragment büyüklüğüdür. Literatürde KGH uygulamasında önerilen DNA fragment uzunluğunda çeşitlilik gözlenmektedir. Uzunluğun 100bç ile 2300bç arasında değişen uzunluklarda olması gerektiğini belirten çalışmalara rastlanmıştır[47,48,52,62]. Laboratuvarımızda en iyi sonuçlar fragment uzunluğu 200-700bç arasında olan DNA'larda elde edilmiştir ki bu da literatürde belirtilen değerler arasındadır. Çalışmamızın ilk dönemlerinde <200bç'den küçük DNA fragmentleri olan örneklerde yapılan hibridizasyonda sonuçları etkileyecek oranda spesifik olmayan floresan sinyaller gözlenirken fragment büyüklüğü >700bç olan örneklerde de sonuç almamızı sağlayacak floresan sinyaller gözlenemedi. Tekrarlanan deneyler sonucunda laboratuvarımızda en iyi sonuç veren DNA büyüklüğü 200-700bç olarak saptandı. Tüm örneklerde de bu aralık dikkate alındı.

Test ve referans DNA ların işaretlenmesinde kullanılan Nick Translasyon ve PCR ile işaretleme yöntemlerinin KGH bulgularında herhangi bir etkisi gözlenmedi. Yöntemler arasındaki tek farklılık oluşan DNA fragment büyüklükleriydi. PCR ile işaretleme sonrası elde edilen ürünlerde fragment büyüklükleri genellikle 200bç ile 1200bç arasında bir smear şeklindeydi. Ancak bunlar DNase kesim işlemleri yapılarak uygun büyüklüklere (200-700bç) getirildi ve başarılı KGH sonuçları elde edildi. Buna karşılık Nick translasyon ile işaretlemede DNA fragment büyüklükleri homojen bir dağılım göstererek 200-700bç uzunluğunda fragmentler elde edildi. Bunun enzim konsatrasyonu ile inkübasyon sürelerinin optimum olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Solid tümörlerin kromozom analizi başarı oranı düşük, zor, zaman ve emek isteyen bir işlemdir. Bu nedenle 1980'li yıllardan günümüze kadar yeni moleküler sitogenetik yöntemlerin gelişmesi ile solid tümörlerde bu yöntemler ile kromozom aberasyonlarının tanısına gidilmiştir[67]. Kolorektal karsinom örneklerinde de konvansiyonel sitogenetik analiz verileri çok yetersiz iken FISH ve KGH analizleri yüzlerce primer tümör örneğinde uygulanmıştır. Sınırlı sayıdaki sitogenetik analiz verileri ile KGH analiz verileri birlikte değerlendirildiğinde, primer tümörlerde rastgele

olmayan kromozom 7q, 8q, 13q, 20q artışları ile 8p, 17p ve 18q kayıplarının sık görülen kopya değişimleri olduğu bildirilmektedir[3,21,26,27,43,75,76,97]. Ancak kolorektal kanser hastalarının ölümünde metastaz nedeniyle ölüm tüm kolorektal kanser tanısı alan olgular arasında anlamlı bir oranı oluşturmamasına rağmen metastazlardaki genomik kopya değişimleri son yıllarda incelenmeye başlanmıştır[7,26,27,64,73,75]. Bu nedenle, çalışmamızda 25 primer tümör ile birlikte 4 karaciğer metastazı, 8 lenf nodu metastazı ve 1 over metastazı analiz edildi. Sonuçlarımız içinde literatürle uyumlu olan sonuçlar yanında uyumlu olmayan sonuçlarımız da vardı. Diğer taraftan bu güne kadar yapılan KGH analizlerinde kolorektal kansere ilişkin primer tümörler ile metastazları klasik KGH yöntemiyle değerlendirilmiştir. Ulaşabildiğimiz literatürlerde kolorektal karsinom örneklerinin YR-KGH verilerine rastlanmadığından çalışmamız primer tümörler ile metastazlarında gözlenen anomalilerin YR-KGH ile değerlendirilmesi bakımından ilk çalışmadır.

Çalışmamızda metastatik lezyonlardaki kopya sayı değişim oranı 17.2/tümör olarak saptandı. Literatürde metastatik lezyonlardaki anomali sıklığı en fazla 14/tümör olarak Diep ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada belirtilmiştir[27]. Görüldüğü üzere çalışmamızda saptanan oran literatüre göre yüksektir. Bunun nedeninin kullanılan yöntem farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çünkü normal KGH ile >5-10 Mb büyüklüğündeki anomaliler saptanırken YR-KGH ile >2-3 Mb büyüklüğündeki değişimler gözlenmektedir. Kromozomal instabilitenin yüksek oranda gözlendiği bu tümörlerde anomali oranının yüksek olması beklenen bir durumdur[16,34,43,89,94,95,108].

Bu güne kadar birçok çalışmada spesifik kromozom değişimleri rapor edilmiştir. Çalışmamızda değerlendirmeye aldığımız primer tümör örneklerinde 1q, 2p, 2q, 3p, 3q, 4q, 6p, 6q, 7p, 7q, 8q, 10q, 11q, 11p, 12q, 13q, 14q, 15q, 16q, 19p, 19q, 20p,20q, kromozom artışları saptanmıştır. Çalışmamızda kromozom 7p12 ve 7p21 bölgeleri ile 2p artışları yüksek sıklıkta gözlenmiş olup bu anomaliler bugüne kadar yapılan ve bizim ulaşabildiğimiz çalışmalarda gözlenmeyen anomalilerdi. Diğer taraftan

kromozom 2q [43,83], 6q [7,43,83,87], 10q [43,83], 15q [7,43] artışları literatürden daha sık gözlemlendi. Primer tümörlerde saptadığımız diğer genomik kopya delesyon tipleri ve sıklıkları literatür ile uyumluluk gösteriyordu[4,7,11,27,64,75,76,83,86,87,93,94,95].

Karaciğer metastazlarında kromozom 5p14 artışı yüksek sıklıkta görülmüş olup bu anomali de literatürde bildirilmemiştir. Karaciğer metastazlarında saptanan diğer genomik kopya aberasyonları (3q, 5q, 6q, 7q, 7p, 8q, 9q, 11p, 12p, 12q, 13q, 15q, 16p, 16q, 17q, 19p, 19q, 20q artışları ile 18q, 8p, 5q kayıpları) literatürle uyumlu fakat literatür oranlarına göre daha yüksek sıklıkta saptanmıştır[4,7,26,27,73,75,76,87].

Lenf tümör metastazlarında saptanan kromozom 5q, 3p22 ve 3p25 ile 10p12 artışları önceki çalışmalarda rapor edilmemiş anomalilerdi. Bu bölgeler haricinde lenf nodu örneklerinde saptanan diğer anomaliler literatürdeki çalışmaların verileri ile uyumludur[4,75,76].

Çalışmamızda saptanan 4q, 5q, 8p, 17p, 18q delesyonları arasında en sık gözlenen anomali 18q delesyonudur. Bu kayıp daha önceki KGH çalışmalarında da en çok gözlenen anomali olarak bildirilmekte olup 18q ve 17p kayıplarının zayıf prognozla ilişkili olduğu belirtilmiştir[4,7,11,26,27,64,75,76,83,86,87,93,94,95]. Kromozom 18'in q kolunda lokalize 3 tane tümör süpresör gen bulunmaktadır: DCC, Smad2, Smad4/DPC4, SMAD7[4,75]. Yapılan çalışmalar 18q'da lokalize bir ya da daha fazla genin aktivitesinin kaybolmasının tümör gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermiştir[4,7,26,75]. Bir çok çalışmada kromozom 18q kolunun allelik kaybı ve bu bölgede yer alan DCC gen ekspresyon kaybının kolorektal kanserlerin kötü prognoz belirleyicisi olduğunu göstermiştir[7,27]. Bizim çalışmalarımızda da 18q kaybı en sık görülen değişimlerden olurken bu anomali sıklığı metastazlarda primer tümörlere göre daha yüksek sıklıktaydı (primer tümör 20/25; karaciğer 3/4; lenf nodu 7/8) görüldü. Bunun dışında 5q'daki kayıpların kolorektal tümörjenezisin erken aşamalarında rol aldığı bilinmekle beraber metastazlar da da önemli olabileceği düşünülmektedir[7,75].

Çalışmamızda özellikle primer tümörlerde yüksek sıklıkta gözlenen diğer bir anomali kromozom 17p delesyonudur. Kromozom 17p'de lokalize P53 tümör süpressör geninin kolorektal kanserlerde önemli bir rolü olduğu pek çok literatürde rapor edilmiştir [25,26,72,102].

Yaptığımız analizlerde rasgele olmayan genetik değişimler daha çok metastatik kolorektal karsinomlarda bulundu. Bu değişimler 7p, 8q, 13q ve 20q kromozom kolu artışları ile 4q, 18q, 8p ve 22q kromozom kolu delesyonlarıdır. Bu anomaliler daha önceki KGH literatürleri ile uyumludur[4,7,26,27,73,75,76,87]. Rastgele olmayan bu değişimlerin birikiminde ve primer tümör ile metastazlar arasında farklı değişimlerin olmasında, metastaz ve tümör diseminasyonunun birbirinden bağımsız yollara sahip olmasıyla bir ilgisi olduğunu düşünmekteyiz..

Kromozom 8q23-24'de lokalize C-Myc onkogeninin aşırı ekspresyonu çeşitli neoplazi tiplerinde meydana gelen bir olaydır. Bu bölgenin kanser hücrelerinin transformasyonunda meydana gelen çeşitli hücrel mekanizmaların işleyişiyle ilişkisi bulunmaktadır. C-Myc amplifikasyonu ile ileri evre kolorektal kanser arasındaki bu ilişki daha önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir[7,10,17,38,82]. 8q24 te bulunan MYC onkogeninin aşırı ekspresyonu ve 8q amplifikasyonu prostat kanseri,göğüs kanseri,karaciğer kanserini içine alan çeşitli kanserlerde bulundu. Bizim olgularımızdaki her üç grupta da bu bölgenin kazançları yüksek orandaydı. Yaptığımız çalışmada artış gözlediğimiz 8q23-24 bölgesinde C-Myc onkogenine ek olarak kolorektal kanser metastazlarında etkili olduğu belirtilen PRL-3 onkogeni de bulunmaktadır[33,72]. Diğer bir kromozom kolu amplifikasyonu da 12p'de görüldü. Bu kromozom kolu üzerinde kolorektal tümörigeneziste rol oynadığı bilinen CCND2(Cyclin D2) ve K-Ras onkogenleri bulunmaktadır[72].

Çalışmada saptanan diğer bir genomik kopya artışı kromozom 20q idi. Kolorektal kanserlerdeki 20q anomalilerinin çok kompleks olan değişimleri bu bölgede

kolorektal karsinogeneziste seçilmiş bir çok hedef gen olduğu yönündedir. Bu bölgede bulunan birkaç aday onkogen olan AIB4, ZNF217, CYP24 daha önce özellikle göğüs kanserinde [73,88] ve NCOA3 göğüs kanseriyle birlikte ovaryum, mide ve pankreas kanserinde belirtilmekle birlikte kolorektal kanserlerdeki önemi henüz değerlendirilmemiştir[88].

Analiz yaptığımız olgular arasında bir tane de over metastazı bulunmaktaydı. Bu olguda kromozom 1p34.1-p22, 1q32, 2p, 2q22-q37, 3p13-p24, 3q12-q27, 5q11.2-q22, 5q31.1, 6p21.1-p11.1, 6q, 8q21-qter, 9p21, 10q21.3-q23, 13q21.1, 13q22,13q31, 18q22,20p11.2, 20q11.2, 21q22.1 artışları ile kromozom 22q, 1p36, 16p13.2, 18q delesyonları. Yaptığımız literatür araştırmalarında kolon kanser kaynaklı over metastazlarında görülen değişimlere ilişkin herhangi bir veriye rastlanmadığından bulgularımız yoruma açıktır.

Yaptığımız literatür araştırmalarında rapor edilmeyen ancak çalışmamızda yüksek sıklıkta görülen kromozom artış bölgeleri içerdikleri kanserle ilgili genler açısından değerlendirildiğinde kromozom 2p13-12'de REL, 2p24.1'de N-Myc, MYCNOS, 3p24.2'de THRB, 5q33-35'de CSFR1, 7p12'de EGFR , 3p25'de WNT7A ve 3p21.3'de USP4 proto-onkogenlerinin bulunduğu saptandı. Ancak bu genlerin kolorektal kanser gelişimindeki etkilerine ilişkin veriler henüz yetersizdir. [9,28,40,54,60,65,68,90,91,99,103].

Bu protoonkogenlerden kromozom 2p de lokalize olan N-Myc, çocukluk dönemi nöroblastoma prognozunda önemli bir klinik gösterge olurken aynı bölgedeki REL geninin, primer Hodgkin tümörlerinde önemli patolojik rolü bulunmaktadır[65]. Aynı kromozom kolu üzerinde bulunan MYCNOS diğer bir adıyla N-Cym onkogeni ise N-Myc amplifikasyonu görülen tümör hücre dizileri kadar, fetal gelişim süresince de eksprese olan bir gen bölgesidir. Ayrıca N-Myc ve N-Cym gen ürünlerinin normal

gelişim ve onkogenezis süresince fonksiyonel olarak birbirlerine bağlı olabilecekleri düşünülmektedir[54,90].

3p kromozom kolu üzerinde lokalize THRB onkogeni ise triiyoditronin için bir nükleer hormon reseptörü olarak işlev görür ve bu troid hormonu için birkaç reseptörden biri olarak troid hormonun biyolojik aktivite göstermesinde etkilidir[54,68].

Çalışmamızda görülen 5'inci kromozoma ait artışlar için yaptığımız literatür araştırmalarında 5p kromozom kolu üzerinde bugüne kadar saptanabilen herhangi bir onkogen bulunamamıştır. Fakat 5q33-35'de bulunan CSFR1 onkogeninin makrofaj gelişiminde önemli bir düzenleyici olduğu ve epitelyal meme ve ovaryum kanserleriyle ilişkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca normal ve neoplastik prostat gelişiminde ve büyümesindeki değişimlerle CSFR1 ekspresyonunun arasında ortak bir ilişkinin olduğu görülmüştür[54,60].

Yukarıda sayılan kromozomlar haricinde kolorektal kanserlerde çok yaygın görülen kromozomlardan birisi de 7'nci kromozom idi. Yapılan araştırmalarda genellikle 7q kromozom kolunun artışları saptanmıştır. Fakat bizim çalışmamızda 7'nci kromozomun kısa kolunda da artışlar görüldü. Yine yaptığımız literatür araştırmalarında 7q kadar kromozom 7p de de lokalize çeşitli onkogenlerin olduğunu saptadık. Bunlardan en önemlisi ErbB ailesi olarak bilinen reseptör ailesine ait olan epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR)'üdür. EGFR'nin, tümör büyüme prosesini kolaylaştıran multipl sinyal yollarında görev aldığı bilinmektedir. Son yapılan çalışmalarda da EGFR nin kolorektal kanserlerde aşırı eksprese olduğu bulunmuş fakat bunun prognostik değeri tam olarak değerlendirilememiştir [54,103].

İlk olarak çalışmamızda saptanan diğer bir amplifikasyon kromozom 3p25 dir. Bu bölgede lokalize WNT7A proto-onkogeni sinyal proteinlerini kodlayan ve yapısal genlerden oluşan WNT ailesinin bir üyesidir. Bu genin embriyogenezis sürecinde etkili olduğu, diğer taraftan kolorektal karsinogenezisinde sinyal iletimi

defektleri ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bu bölgede lokalize olan USP4 proto-onkogeninin ise küçük hücreli akciğer kanseri ve adenokarsinomlarında aşırı eksprese olduğu görülmüştür[40,49]. Kolorektal kanserlerdeki ekspresyonuna ilişkin bir bilgiye rastlanmamıştır.

Sonuç olarak bulgularımız literatürde belirtilen KGH analizleri ile büyük bir uyumluluk gösteriyor. Bununla beraber primer tümörlerde kromozom 7p ve 2p kazançları, karaciğer metastazlarındaki 5p14 kazançları ve lenf düğümlerindeki 5q, 3p ve 10p artış anomalileri ilk olarak bizim çalışmamızda gözlenen anomaliler olup bu kromozom bölgelerinin detaylı incelenmesi ile kolorektal kanser gelişimindeki rolleri belirlenebilecektir. Bununla beraber çalışmamızda saptanan anomalilerin olgular arasında görülme sıklıkları da literatüre göre yüksektir. Bunun kullanılan yöntemin farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Bu çalışma primer tümörler ile metastazlarının genomik kopya aberasyonları açısından karşılaştırılmasının önemini vurgulamıştır. Takip edecek çalışmalarda saptanan anomaliler ile hastalığın prognozunun birlikte değerlendirilmesinin kolorektal karsinogenezis mekanizmalarını belirleyerek bu bilgilerin hasta tedavisine yönelik kullanılmasına ve yeni aday tümör süpresör gen ve onkogenlerin saptanması için bir temel oluşturacağını düşünmekteyiz.

6.SONUÇ

Kolorektal kanserlerde, primer tümörler ile metastazlarında genomik kopya değişimlerinin YR-KGH ile incelenmesi ve aberasyonların karşılaştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada 38 parafin dokuda YR-KGH analizleri yapıldı ve bu dokular arasındaki bulgular birbirleriyle karşılaştırıldı.

Başarılı bir KGH için test-referans DNA miktarlarının, DNA fragment uzunluğunun, kaliteli metafaz preparatının önemi çalışmamızda da gösterilmiştir. Çalışmamızda her YR-KGH'da bir negatif kontrol kullanılmıştır. Ancak negatif kontrol ile pozitif kontrolün birlikte kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

Yüksek rezolüsyonlu KGH tekniği normal KGH'ya göre daha hassas, genomik kopya değişimleri daha yüksek oranda saptama olanağı veren bir yöntemdir. Çalışmamızda bu yöntemin hassasiyeti verilerimizde de gözlenmiştir. Bugüne kadar normal KGH ile gözlenememiş ancak iki ve daha fazla tümör materyalinde görülerek kolorektal kansere spesifik olduğu düşünülen kromozom 2p,3p,5p,5q,7p,10p anomalileri ilk olarak çalışmamızda ortaya konmuştur.

Kolorektal kanserlerde, hücrel farklılaşma azaldıkça genomik kopya aberasyon oranının arttığı çalışmamızda da gözlenmiştir. İyi diferansiye örneklerde anomali oran 6,5/tümör iken orta ve kötü diferansiye örneklerdeki oranlar 14,8/tümör ve 21/tümör dür. Kromozom instabilite kolorektal kanserlerin oluşumunda önemli bir mekanizmadır.

Primer tümörlerde 1p, 1q, 2p, 2q, 3p, 3q, 4q,6p, 6q, 7p,7q, 8q, 10q, 11p, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 16q, 19q, 19p, 20p, 20q artışları ile kromozom 4q, 8p, 17p, 18q, 18p ve 22q delesyonları ortak anomalilerdi. Bu anomaliler kolorektal kanserlerin KGH ile incelendiği literatürlerdeki değişimlerle uyumlu anomalilerdir. Ancak kromozom 7p ve 2p artışları ilk olarak çalışmamızda gözlenen anomalilerdir. Bu kromozomlarda aday onkogenlerin (REL, N-Myc, MYCNOS, EGFR) kolorektal karsinogeneziste önemli olabileceğini düşünmekteyiz.

Primer tümörlere göre metastazlardaki anomali sıklığı çok daha yüksektir. Diğer tarafta karaciğer metastazlarda hemen tüm kromozomları tutan genomik kopya artışları dikkati çekmiştir. Özellikle 9q, 12p, anomalileri sadece karaciğer metastazlarında, 10p de sadece lenf nodu metastazında gözlenen anomalilerdi.

İncelenen lenf nodlarında ise 2q, 3p, 3q, 5q, 6q, 7p, 7q, 8q, 10p, 13q, 20q, artışları literatürlerde de görülen ortak artışlar olurken ortak kopya delesyonları kromozom 4q, 8p ve 18q idi. Literatürle uyumlu olmayan kromozom 3p,5q ve 10p artışlarının karsinogeneziste etkili olabileceğinin, bu kromozomlarda lokalize THRB, WNT7A, USP4, CSFR1 onkogenlerinin metastatik mekanizmalarda rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ancak geniş araştırma gruplarında incelemelerin yapılması zorunludur.

Çalışmada incelenen olgular arasında bir tane over metastazı bulunmaktaydı. Yapılan YR-KGH analizinde bu olgunun over metastazı dokusunda 1p, 1q, 2, 3, 5, 6, 8q, 9p, 10q, 13q, 18q, 20, 21q kazançları ile 1p, 16p, 18q, 22q kayıpları bulundu.

Sonuç olarak, çalışmamız kolorektal kanser örneklerinin YR-KGH yöntemi ile analiz edildiği ilk çalışmadır. Primer tümörler ile metastazlarının daha geniş popülasyonlarda YR-KGH ile incelenmesi, kolorektal karsinogenezis mekanizmalarında

etkili olan genlerin ortaya konmasında büyük avantajlar sağlayacaktır. Diğer taraftan geniş populasyonlarda metastaz gelişen primer tümörlere spesifik anomalilerin ortaya konması, bu anomalilere sahip hastaların takibi ve tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine bir temel oluşturacaktır. Ayrıca saptanan anomaliler ile hastalığın prognozunu karşılaştırma olanağını da sağlayacaktır.



7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. ALBERTS,B.; BRAY,D.; LEWIS,J.; RAFF,M.; ROBERTS,K.; WATSON,J.D.: The molecular biology of the cell, Third Edition, Garland Publishing Inc.,New York&London, 1994.
2. ALBERTSON,D.G.; COLLINS,C.; MCCORMICK,F.; GRAY,J.W.: Chromosome aberrations in solid tumors, Nat. Genetic, 34:369-376, 2003.
3. ALCOCK,H.E.; STEPHENSON,T.J.; ROYDS,J.A.; HAMMOND,D.W.: Analysis of colorectal tumor progression by microdissection and comparative genomic hybridisation, Genes Chromosomes Cancer, 37:369-380, 2003.
4. AL-MULLA,F.; KEITH,W.N.; PICKFORD,I.R.; GOING,J.J.; BIRNIE,G.D.: Comparative genomic hybridisation analysis of primary colorectal carcinomas and their synchronous metastases, Genes Chromosomes Cancer, 24 (4): 306-314, 1999.
5. ANGELA,M.; DOUGLAS,E.J.; HALFORD,S.E.R.; FIEGLER,H.; GORMAN,P.A.; ROYLANCE,R.R.; CARTER,N.P.; TOMLINSON,I.P.M.: Array-CGH analysis of microsatellite-stable, near-diploid bowel cancer and comparison with other types of colorectal carcinoma, Oncogene, 24:118-129, 2005.
6. ANTALIS,T.M.; REEDER,J.A.; GOTLEY,D.C.; BYEON,M.K.; WALSH,M.D.; HENDERSON,K.W.; PAPAS,T.S.; SCHWEINFEST,C.: Down-regulation of the down-regulated in adenoma (DRA) gene correlates with colon tumor progression, Clin Cancer Res., 4(8):1857-63, 1998.
7. ARAGANE,H.; SAKAKURA,C.; NAKANISHI,M.; YASUOKA,R.; FUJITA,Y.; TANIGUCHI,H.; HAGIWARA,A.; YAMAGUCHI,T.; ABE,T.; INAZAWA,J.; YAMAGISHI,H.: Chromosomal aberrations in colorectal cancers and liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization, Int. J. Cancer, 94(5):623-9, 2001.

8. ARENDS,J.W.: Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma, J. Pathol., 190:412-416, 2000.
9. ARMSTRONG,B.C.; KRYSTAL,G.W.: Isolation and characterization of complementary DNA for N-cym, a gene encoded by the DNA strand opposite to N-myc, Cell Growth Differ., Jun, 3(6):385-90, 1992.
10. ARTAN,S.: Rutin FISH uygulamaları, GENTAM bilteni,ETAM A.Ş. sayfa 51-51, 1996.
11. BARDI,G.; SUKHIKH,T.; PANDIS,N.; FENGER,C.; KORNBORG,O.; HEIM,S.: Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinomas, Genes Chromosomes Cancer, 12(2):97-109, 1995.
12. BAŞARAN,N.: Moleküler sitogenetik analiz yöntemi ve uygulama alanları (FISH), GENTAM Bülteni, Etam A.Ş., sayfa 5-10,1996
13. BAŞARAN,N.: Tıbbi Genetik, 7. Baskı, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi, Bursa, 1999.
14. BOMME,L.; BARDI,G.; PANDIS,N.; FENGER,C.; KRONBORG,O.; HEIM,S.: Cytogenetic analysis of colorectal adenomas: karyotypic comparisons of synchronous tumors, Cancer Genet. Cytogenet., Oct. 1;106(1):66-71, 1998.
15. BOMME,L.; LOTHE,R.A.; BARDI,G.; FENGER,C.; KRONBORG,O.; HEIM,S.: Assessments of clonal composition of colorectal adenomas by FISH analysis of chromosomes 1, 7, 13 and 20, Int J Cancer., Jun 15;92(6):816-23, 2001.
16. BREEN,J.C.; BARTON,L.; CAREY,A.; DUNLOP,A.; GLANCY,M.; HALL,K.; HEGARTY,A.M.; KHOKHAR,M.T.; POWER,M.; RYAN,K.; GREEN,A.J.; STALLINGS,R.L.: Applications of comparative genomic hybridisation in constitutional chromosome studies, J.Med.Genet., 36(7):511-517, 1999
17. BUFFART,T.E.; COFFA,J.; HERMSEN,M.A.; CARVALHO,B.; VAN DER SIJP,J.R.; YLSTRA,B.; PALS,G.; SCHOUTEN,J.P.; MEIJER,G.A.: DNA copy number changes at 8q11-24 in metastasized colorectal cancer, Cell Oncol., 27(1):57-65, 2005.

18. COOPER,M.: The cell,A molevular approach, ASM Press Washington ,D.C., 1997.
19. COX, T:M.; SINCLAIR,J.: Molecular Biology in Medicine, Blackwell Science, 1997.
20. DANIELY,M.; BARKAI,G.; GOLDMAN,B.; AVIRAM-GOLDRING: Detection of numerical chromosome aberations by comtparative genomic hybridisation,Prenatal Diagnosis,19:100-104,1999.
21. DE ANGELIS,P.M.; CLAUSEN,O.P.; SCHJOLBERG,A.; STOKKE,T.: Chromosomal gains and losses in primary colorectal 'carsinomas detected by CGH and their associations with tumour DNA ploidy, genotypes and phenotypes, Br. J. Cancer, 80(3-4):526-35, 1999.
22. DE ANGELIS,P.M.; STOKKE,T.; BEIGI,M.; MJALAND,O.; CLAUSEN,O.P.: Prognostic significance of recurrent chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization in sporadic colorectal cancer, Int. J. Colorectal Dis., 16(1):38-45, 2001.
23. DEĞERLİ,Ü.; BOZFAKIOĞLU,Y.(Editörler): Cerrahi Gastroenteroloji, Beşinci baskı, Nobel tıp kitap evi, İstanbul, 2000.
24. DEVIRES,S.; GRAY,J.W.; PINKEL,D.: WALDMAN,F.M.; SUDAR,D.: Comparative genomic hybridisation, Current Protocols İn Human Genetics, 4.6.1-4.6.18, Copyright by Wiley&Sons,New York, 2000.
25. DIEP,B.; THORSTENSEN,L.; MELING,G.I.; SCOV LUND,E.; ROGNUM,T.O.; LOTHE,R.A.: Genetic tumor markers with prognostic impact in Dukes' stages B and C colorectal cancer patients, J. Of Clin. Oncol., 21:820-829, 2003.
26. DIEP,B.C.; PARADA,L.A.; TEIXEIRA,M.R.; EKN&S,M.; NESLAND,J.M.; JOHANSSON,B.; LOTHE,R.A.: Genetic profiling of colorectal cancer liver metastases by combined comparative genomic hybridisation and G-banding analysis, Genes Chromosomes Cancer, 36:189-197, 2003

27. DIEP,B.C.; TEIXEIRA,R.M.; THORSTENSEN,L.; WIIG,N.J.; EKNæs,M.; NESLAND,M.J.; GIERCKSKY,K.E.; JOHANSSON,B.; LOTHE,A.R.: Genome characteristics of primary carcinomas,local recurrences and liver metastases from colorectal cancer patients, *Molecular cancer*, 2004.
28. DIMRI,G.P.; MARTINEZ,J.L.; JACOBS,J.J.; KEBLUSEK,P.; ITAHANA,K.; LOHUIZEN,M.; CAMPISI,J.; WAZER,D.E.; BAND,V.: The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells, *Cancer Res.*, Aug., 15;62(16):4736-45, 2002.
29. DU MANOIR,S.; SPEICHER,S.; JOOS,E.; SCHROCK,S.; POPP,H.; DOHNER,G.; KOVACS,M.; LICHTER & T.CREMER: Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomi hybridisation, *Hum.Genet.*, 90:590-610, 1993.
30. DU MANOIR,S.; KALLIONIEMI,O-P.; LICHTER,P.; PIPER,J.; BENEDETTI,P.A.; CAROTHERS,A.D.; FANTES,J.A.; GARCIA-SAGREDO,J.M.; GERDES,T.: Hardware and software requirements for quantitative analysis of comparative genomic hybridisation, *Cytometry*, 19:4-9, 1995.
31. DU MANOIR,S.; Schrock,E.; Bentz,M.; Speicher,M.R.; Joos,S.; Ried,T.; Lichter,P.; Cremer,T.: Quantitative analysis of comparative genomic hybridisation,Cytometry,19:27-41,1995.
32. FEARON,E.R.; VOGELSTEIN,B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell*, 61:759-767, 1990.
33. FODDE,R.; SMITS,R.; CLEVERS,H.: APC,signal transduction and genetic instability in colorectal cancer, Macmillian Magazines Ltd., *Nature Reviews/Cancer*, Volume 1, 2001.
34. FORAZAN, F.; KARHU, R.; KONONEN, J.; KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O. P.: Genome screening by comparative genomic hybridisation, *TIG.*, 13:10, 1997.

35. FRANKS,L.M.; TEICH,N.M.: Cellular and molecular biology of cancer, Thied edition,Oxford Uni. Press,1998.
36. GARNIS,C.; BUYS,T.P.H.; LAM,W.L.: Gentic alteration and gene expression modulation during cancer progression, Molecular Cancer,Review, 3:9, 2004.
37. GELEHRLER,T.D.; COLLINS,F.S.; GINSBURG,D.: Principles of Medical Genetic,Second Edition, 1998.
38. GHADIMI,B.M.; GRADE,M.; LIERSCH,T.; LANGER,C.; SIEMER,A.; FUZESI,L.; BECKER,H.: Gain of chromosome 8q23-24 ic predictive marker for lymph node positivity in colorectal cancer, Clin.Cancer Res., 9:1808-1814,2003.
39. GHAFFARI,S.R.; BOYD,E.; TOLMIE,J.L.; CROW,J.Y.; TARINER, A.H.; CONNOR,J.M.: A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental reterdation, J.Med.Genet., 35:225-33, 1998.
40. GRAY,D.A.; INAZAWA,J.; GUPTA,K.; WONG,A.; UEDA,R.; TAKAHASHI,T.: Elevated expression of Unph,a proto-oncogene at 3p21.3, in human lung tumors, Oncogene, 10(11):2179-2183, 1995.
41. GREENLEE,R.T.; MURRAY,T.; BOLDEN,S.; WINGO,P.A.: Cancer Statistics, Cancer J Clin., 50:7-33,2000.
42. HARGROVE,J.L.: A multistage model for tumor progression, Dynamic Modelling in thee Health Sciences, Springer-Verlang, New York, 1998.
43. HE,Q.J.; ZENG,W.F.; SHAM,J.S.; XIE,D.; YANG,X.W.; LIN,H.L.; ZHAN,W.H.; LIN,F.; ZENG,S.D.; NIE,D.; MA,L.F.; LI,C.J.; LU,S.; GUAN,X.Y.: Recurrent genetic alterations in 26 colorectal carcinomas and 21 adenomas from Chinese patients, Cancer Genetics and cytogenetics,144:112-118, 2003.
44. HERMSEN,M.; POSTMA,C.; BAAK,J.; WEISS,M.; RAPALLO,A.; SCIUTTO,A.; ROEMEN,G.; ARENDS,J.W.; WILLIAMS,R.; GIARETTI,W.; DE GOEIJ,A.;

MEIJER,G.: Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability, *Gastroenterology*, 123(4):1109-19, 2002.

45. HENAGARIU,O.; HEEREMA,N.M.; WRIGHT,L.L.; BRAYWARD,P.; WARD,D.C.; VANCE,G.H.: Improvements in cytogenetics slide preparation; Controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing, *Cytometry*, 43:101-109, 2001

46. <http://www.bilkent.edu.tr/~infobil/tani/kolorektal.html>

47. http://www.bioserver.uniba.it/fish/rocchi/webbari/0-1a_pagina/2_2_Protocols.html.

48. <http://cc.ucsf.edu/people/waldman/Protocols/directcgh.html>.

49. <http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm736/cancer.htm>

50. http://www.hmds.org.uk/fish_cgh.html.

51. <http://www.ich.ucl.ac.uk/cmgs/cgh98.htm>

52. <http://www.info.med.yale.edu/genetic/word/tavi/p01.html>.

53. <http://www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem1/dersler/kansergenetikaekmekci.htm>.

54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>

55. http://www.ntu.edu.sg/home2004/TAYS0008/Comparative_Genomic_Jybridisation_and_Oncological_Studies.htm.

56. <http://www.saglikbakanligi.gov.tr>

57. <http://www.science.cancerresearchuk.org/research/loc/london/lifch/tomlinsoni/tomlinsoniproj?version=3>

58. <http://www.tip2000.com/tedavi/kolon-rektum/main.htm>.

59. <http://www.vysis.com>.

60. IDE,H.; SELIGSON,D.B.; MEMARZADEH,S.; XIN,L.; HORVATH,S.; DUBEY,P.; FLICK,M.B.; KACINSKI,B.M.; PALOTIE,A.; WITTE,O.N.: Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Oct., 29;99(22):14404-9, 2002.
61. ISOLA,J.; DEVIRES,S.; CHU,L.; GHAZVINI,S.; WALDMAN,F.: Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridisation in archival paraffin-embedded tumor samples, *Am. J. Pathol.*, 145:1301-1308, 1994.
62. JAMES,L.; VARLEY,J.: Preparation,labelling and detection of DNA from archival tissue section suitable for comparative genomic hybridisation, *Chromosome Res.*, 4:163-164, 1996.
63. JEMAL,A.; THOMAS,A.; MURRAY,T.; THUN, M.: Cancer Statistics, *Cancer J Clin.*, 52:23-47,2002.
64. JIANG,J.K.; CHEN,Y.J.; LIN,C.H.; YU,I.T.; LIN,J.K.: Genetic changes and clonality relationship between primary colorectal cancers and their pulmonary metastases--an analysis by comparative genomic hybridization, *Genes Chromosomes & Cancer*, May;43(1):25-36, 2005.
65. JOSS,S.; GRANZOW,M.; HOLTGREVE-GREZ,H.; SIEBBERT,R.; HARDER,L.; MARTIN-SUBERO,J.I.; WOLF,J.; ADAMOWICZ,M.; BARTH,T.F.E.; LICHTER,P.; JAUCH,A.: Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosome 2p and 9p including REL and JAK2, *Int. J.Cancer*, 103:489-495, 2003.
66. KALLIONIEMI,A.; KALLIONIEMI,O.P.; SUDAR,D.; RUTOVITZ,D.; GRAY,J.W.; WALDMAN,F.M.; PINKEL,D.: Comparative genomic hybridisation for molecular cytogenetic analysis of solid tumors,*Science*, 258:8181-21, 1992.
67. KALLIONIEMI,O.P.; KALLIONIEMI,A.; PIPER,J.; ISOLA,J.; WALDMAN,F.M.; GRAY,J.W.; PINKEL,D.: Optimizing comparative genomic hybridisation for analysing of sequence copy number changes in solid tumors, *Genes Cancer & Cancer*, 10:231-243, 1994.

68. KAYAHARA,H.; YAMAGATA,H.; TANIOKA,H.; MIKI,T.; HAMAKAWA,H.: Frequent loss of heterozygosity at 3p25-p26 is associated with invasive oral squamous cell carcinoma, *J. Hum. Genet.*, 46(6):335-41, 2001.
69. KIRCHHOFF,M.; GERDES T, ROSE H, MAAHR J, OTTESEN AM, LUNDSTEEN C.: Detection chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridisation analyses on standard reference intervals, *Cytometry*, 31:163-173, 1998.
70. KIRCHHOFF, M.; GERDES, T.; MAAHR, J.; ROSE, H.; BENTZ, M.; DOHNER, H. & LUNDSTEEN, C.: Deletions below 10 megabase pairs are detected in comparative genomic hybridisation by standard reference intervals, *Genes Chromosome& Cancer*,25:410-413,1999.
71. KIRCHHOFF,M.; ROSE,H.; LUNDSTEEN,C.: High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics, *J.Med.Genet.*, 38:740-744, 2001.
72. KLEIVI,K.; TEIXEIRA,R.M.; EKNÆS,M.; DIEP,C.B.; JAKOBSEN,K.J.; HAMELIN,R.; LOTHE,R.A.: Genome signatures of colon carcinoma cell lines, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 155:119-131, 2004.
73. KORN,W.M.; YASUTAKE,T.; KUO,W.L.; WARREN,R.S.; COLLINS,C.; TOMITA,M.; GRAY,J.; WALDMAN,F.M.: Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization, *Genes Chromosomes Cancer*, 25(2):82-90, 1999.
74. KÖKTÜRK,N.; KIRIŞOĞLU,C.E.; ÖZTÜRK,C.: Akciğer kanser moleküler biyolojisi, *Solunum*, 5:127-138, 2003.
75. KNÖSEL,T.; PETERSEN,S.; SCHWABE,H.; SCHLUNS,K.; STEIN,U.; SCHLANG,P.M.; DIETEL,M.; PETERSEN,I.: Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases., *Virchows Arch.*, 440:187-194, 2002.

76. KNÖSEL,T.; SCHLÜNS,K.; STEIN,U.; SCHWABE,H.; SCHLAG,M.P.; DIETEL, M.; PETERSEN,I.: Chromosomal Alterations During Lymphatic and Liver Metastasis Formation of Colorectal Cancer, *Neoplasia*, 23-28, 2004
77. KUMAR,V.; COTRAN,R.S.; ROBBINS,S.L.; Robbins Temel Patoloji, 7'inci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2003.
78. KUUKASJÄRVI,T.; TANER,M.; PENNANEN,S.; KARHU,R.; VIAKORPI,T.; ISOLA,J.: Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridisation, *Genes Chromosomes & Cancer*, 18:94-101, 1997.
79. LENGAUER,C.; KINZLER,K.W.; VOGELSTEIN,B.: Genetic instabilities in human cancer. *Nature*, 396:643-649, 1998.
80. LESLIE,A.; CAREY,F.A.; PRATT,N.R.; STEELE, R.J.C.: The colorectal adenoma-carcinoma sequence, *British Journal of Surgery, Review*, 89:845-860, 2002.
81. MARKOWITZ,S.: DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancer, *J. Clin. Oncol.*, 18:75-80, 2000.
82. MASRAMON,L.; ARRIBAS,R.; TORTOLA,S.: Moderate amplifications of the C-Myc gene correlate with molecular and clinicopathological parameters in colorectal cancer, *Br. J. Cancer*, 77:2349-2356, 1998.
83. MEIJER, G. A.; HERMSEN, M. A. J. A.; BAAK, J. P. A.; DIEST, P. J. V.; MEUWISSEN, S. G. M.; BELIËN, J. A. M.; HOOVERS, J. M. N.; JOENJE, H.; SNIJDERS,P.J.F.; WALBOOMERS,J.M.M.: Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation, *J. Clin. Pathol.*, 51:901-909, 1998.
84. MEISER,B.; COLLINS,V.; WARREN,R.; GAFF,C.; JHON,D.J.B.; YOUNG,M.A.; HARROP,K.; BROWN,J.; HALLIDAY,J.: Psychological impact of genetic testing for hereditary non-polyposis colorectal cancer, *Clin. Genet.*, 66:502-511, 2004.

85. NACHEVA,E.P.; GRACE,C.D.; BITTNER,M.; LEDBETTER,D.H.; JENKIS,R.B.; GREEN,A.R.: Comparative Genomic hybridisation: A comparison with molecular and cytogenetic Analayses, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 100:93-105, 1998.
86. NAKAO,K.; SHIBUSAWA,M.; TSUNODA,A.; YOSHIZAWA,H.; MURAKAMI,M.; KUSANO,M.; UESUGI,N.; SASAKI,K.: Genetic changes in primary colorectal cancer by comparative genomic hybridization, *Surgery Today-The Japanese Journal Of Surgery*, 28 (5): 567-569, 1998
87. NAKAO,K.; SHIBUSAWA,M.; ISHIHARA,A.; YOSHIZAWA,H.; TSUNODA,A.; KUSANO,M.; KUROSE,A.; MAKITA,T.; SASAKI,K.: Genetic changes in colorectal carcinoma tumors with liver metastases analzed by comparative genomic hybridisation and DNA ploidy, *Cancer*, 91:721-726, 2001.
88. NAKAO, K.; MEHTA, K.R.; FRIDLYAND,J.; MOORE, D.H.; JAIN,A.N.; LAFUENTE,A.; WIENCKE,J.W.; TERDIMAN,J.P.; WALDMAN,F.M.: High-Resolution analysis of DNA copy number alterations in colorectal cancer by array-based comparative genomic hybridisation, *Carcinogenesis*, 25(8):1345-1357, 2004.
89. NESS,G.O.; LYBÆK,H.; HOUGE,G.: Usefulness of High-Resolution comparative genomih Hybridisation (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities, *Am.J. of Med. Genet.*, 113:125-136, 2002.
90. NUSSBAUM,R.L.; MCINNES,R.R.;WILLARD,H.F.: *Thompson&Thompson Tıbbi Genetik*, Güneş Kitabevi, 2005.
91. OHIRA,T.; GEMMILL,R.M.; FERGUSON,K.; KUSY,S.; ROCHE,J.; BRAMBILLA,E.; ZENG,C.; BARON,A.; BEMIS,L.; ERICKSON,P.; WILDER,E.; RUSTGI,A.; KITAJEWSKI,J.; GABRIELSON,E.; BREMNES,R.; FRANKLIN,W.; DRABKIN,H.A.: WNT7a includes E-cadherin in lung cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Sep., 2;100(18):10429-34, 2003.

92. OOSTLANDER,A.E.; MEIJER,G.A.; YLSTRA,B.: Microarray-based comparative genomic hybridisation and its applications in human genetics, *Clin. Genet.*, 66:488-495, 2004.
93. PLATZER,P.; UPENDER,M.B.; WILSON,K.; WILLIS,J.; LUTTERBAUGH,J.D.; NOSRATI,A.; WILSON,J.K.; MACK,D.; RIED,T.; MARKOWITZ,S.D.: Silence of chromosomal amplifications in colon cancer, *Cancer Res.*, 62:1134-1138, 2002.
94. POEAIM,S.; RERKAMNUAYCHOKE,B.; JESDAPATARAKUL,S.; CAMPIRANON,A.; Chromosome alterations in colorectal cancer in Thai patients, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 160:152-159, 2005.
95. POSTMA,C.; HERMSEN,M.; COFFA,J.; BAAK,PA.; MUELLER,J.D.; MUELLER,E.; BETHKE,B.; SCHOUTEN,J.P.; STOLTE, M.; MEIJER, G.A.: Chromosomal instability in flat adenomas and carcinomas of the colon, *J. Pathol.*, 205: 514-521, 2005.
96. PONZ,D.L.M.; RONCUCCI,L.: The cause of colorectal cancer, *Digest. Liver Dis.*, 32:426-439, 2000.
97. RICHTER,H.; SLEZAK,P.; WALCH,A.; WERNER,M.; BRASELMAN,H.; JARAMILLO,E.; OST,A.; HIRATA,I.; TAKAHAMA,K.; ZITZELSBERGER,H.: Distinct chromosomal imbalances in nonpolypoid and polypoid colorectal adenomas indicate different genetic pathways in the development of colorectal neoplasms., *Am. J. Pathol.*,163:287-294, 2003.
98. RIED,T.: *Cytogenetics Methods. Genome technology branch, national human genome research institute/NIH*, Sep., 1999.
99. ROBERTSON,N.G.; MORTON,C.C.: Mapping and characterization of a novel human myc-like (MYCLK1) sequence, *Genomics*, Jun., 13(2):449-451, 1992.
- 100- SAYEK,İ.: *Temel Cerrahi*, Cilt 1, İkinci baskı, Güneş Kitabevi, 1996.

- 101- SASAKI,K.; KAWAUCHI,S.: Molecular cytogenetic analysis of solid tumors, J. Orthop. Sci., 8:457–459, 2003.
- 102- SMITH,G.; CAREY,F.A.; BEATTIE,J.; WILKIE,M.J.; LIGHTFOOT,T.J.; COXHEAD,J.; GARNER,R.C.; STEELE,R.J.; WOLF,C.R.: Mutations in APC,Kirstenras and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 99:9433-9438, 2002.
- 103- SPANO,J.P.; FAGARD,R.; SORIA,J.C.; RIXE,O.; KHAYAT,D.; MILANO,G.: Epidermal growth factor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives, Ann. Oncol., 16(2):189-194, 2005.
- 104- SCHWEINFEST,C.W.; HENDERSON,K.W.; SUSTER,S.; KONDOH,N.; PAPAS,T.S.: Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas, Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A., May 1;90(9):4166-70,1993.
- 105- TSUBOSA,Y.; SUGIHARA,H.; MUKAISHO,K.; KAMITANI,S.; PENG,D.P.; LING, Z.Q.; TANI,T.; HATTORI,T.: Effects of degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction amplification and labelling methods on the sensitivity of metaphase and array-based comparative genomic hybridisation, Cancer Genetic and Cytogenetics, 158:156-166, 2005.
- 106- VENDRELL,E.; MORALES,C.; RISQUES,R.A.; CAPELLÁ,G.; PEINADO,M.A.: Genomic determinants of prognosis in colorectal cancer, Cancer Letters xx, 1-9, 2004.
- 107- WALKER,J.; QUIRKE,P.: Biology and genetics of colorectal cancer, University of Leeds, Department of Histopathology, Leeds,U.K., S163-172, 2002.
- 108- WEIMER,J.; KIECHLE,M.; WIEDEMANN,U.; TONNIES,H.; NEITZEL,H.; RUHENSTROTH,E.; OVENS-RAEDER,A.; ARNOLD,N.: Delineation of a complex karyotypic rearrangement by microdissection and CGH in a family affected with split foot, J.Med. Genet., 37:442-445, 2000.

ÖZGEÇMİŞ

18.11.1980 Eskişehir doğdu. İlk öğrenimini Osmangazi İlkokulu, orta öğrenimini Osmangazi Ortaokulu'nda yaptı. 1998 yılında Prof. Dr Orhan Oğuz Lisesi'nde ortaöğrenimini tamamladı. 1999 yılında Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2003 yılında mezun olarak Biyolog ünvanını aldı. 2003 yılında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.