

**GASTROİNTESTİNAL KANSERLİ HASTALARDA APC, p16
VE RASSF1A GENLERİNİN METİLASYON PROFİLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF METHYLATION PROFILES OF APC,
p16 AND RASSF1A GENES IN PATIENTS WITH
GASTROINTESTINAL CANCER**

BERİL ERDEM

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

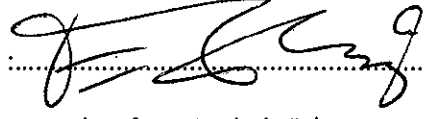
olarak hazırlanmıştır.

2011

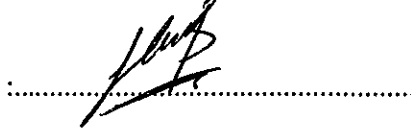
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından BİYOLOJİ ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan


(Prof. Dr. Erol Aksöz)

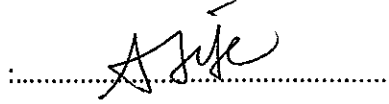
Üye (Danışman)


(Doç. Dr. Hatice Mergen)

Üye


(Prof. Dr. Sibel Sümer)

Üye


(Doç. Dr. Afife İzbirak)

Üye


(Yrd. Doç. Dr. Mehmet Karaca)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil Denizli

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

GASTROİNTESTİNAL KANSERLİ HASTALARDA *APC*, *p16* VE *RASSF1A* GENLERİNİN METİLASYON PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Beril Erdem

ÖZ

Kanser, hücresel düzenin bozulmasıyla meydana gelir. Epigenetik, bu bozulmaya neden olan durumlardan biridir. Kansere neden olan proto-onkogenler ile tümör baskılayıcı genleri etkileyen epigenetik faktörler, son yıllarda ilgi gören araştırma konuları arasındadır. Epigenetik mekanizmalardan biri olan DNA metilasyonu, kanserin erken evrelerinde meydana gelir. Tümör baskılayıcı genlerin sessizleştirilmesine neden olan promotor bölgesi metilasyonu, birçok kanser türünde ve bu kanserlerin oluşumunda yer alan genlerde araştırılmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, gastrointestinal tümörlerin oluşumunda yer aldığı düşünülen bazı tümör baskılayıcı genlerin (*APC*, *p16* ve *RASSF1A*) promotor bölgelerinin metilasyon profillerinin araştırılmasıdır.

Bu amaçla, *APC*, *p16* ve *RASSF1A* genlerinin metilasyon profillerini araştırmak için 20 gastrointestinal (özefagus, mide ve kolorektal) karsinoma hastasının doku örnekleri ve kontrol grubunu oluşturan 15 bireyin periferik kan örnekleri kullanılarak Metilasyona özgü polimeraz zincir reaksiyonu (MSP) ile analiz edilmiştir.

MSP analizi sonucunda, hasta grubunda *APC*, *p16* ve *RASSF1A* genlerinde sırasıyla %50 (10/20), %30 (6/20) ve %10 (2/20) oranında metilasyon olduğu belirlenmiştir. Hasta ve kontrol gruplarına ait bireyler arasındaki *APC* ve *p16* genlerinin promotor bölgelerindeki metilasyon profili farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu (sırasıyla $p=0,008$, $p=0,013$) buna karşılık, *RASSF1A* geni için bu farkın anlamlı olmadığı bulunmuştur. Tümörün lokalizasyonu ile *APC* geni promotor bölgesi metilasyonu arasındaki farkın anlamlı ($p=0,003$), *p16* ve *RASSF1A* genlerinin promotor bölgesi metilasyonu ile tümörün yerleşimi arasındaki farkın ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Tez çalışması sonucunda, gastrointestinal tümör oluşumunun erken evrelerinde meydana geldiği düşünülen tümör baskılayıcı genlerdeki metilasyon varlığı, *APC* ve *p16* genlerinde doğrulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: MSP, Bisülfid dönüşümü, Tümör baskılayıcı genler, *APC*, *p16*, *RASSF1A*, Gastrointestinal tümörler, Metilasyon

Danışman: Doç.Dr. Hatice Mergen, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

INVESTIGATION OF METHYLATION PROFILES OF *APC*, *p16* AND *RASSF1A* GENES IN PATIENTS WITH GASTROINTESTINAL CANCER

Beril Erdem

ABSTRACT

Cancer is a consequence of disruption of cellular regulation. Epigenetic is one of the reasons which makes this disruption. Epigenetic factors which have a role in carcinogenesis by affecting proto-oncogenes and tumor suppressor genes, have been among the most popular research areas in recent years. DNA methylation, which is an epigenetic mechanism, occurs in early stages of tumorigenesis. Promoter hypermethylation which causes to silence tumor suppressor genes have been studied extensively in various tumor types.

The aim of this study was to investigate promoter hypermethylation profiles of certain tumor suppressor genes (*APC*, *p16* and *RASSF1A*) which play a part in gastrointestinal tumorigenesis.

To detect the promoter hypermethylation profiles of *APC*, *p16* and *RASSF1A* genes, tissue samples from 20 gastrointestinal carcinoma patients (esophagus, stomach and colorectal) and peripheral blood samples from 15 healthy individuals were collected for Methylation specific polymerase chain reaction (MSP) analysis.

Statistical analysis was done after MSP. In tumor tissues, positive promoter hypermethylation ratio of *APC*, *p16* and *RASSF1A* genes were found respectively 50% (10/20), 30% (6/20) and 10% (2/20). The difference of promoter methylation of *APC* and *p16* genes between tumor tissues and control group was significantly observed (respectively $p=0,008$, $p=0,013$) but there was no significant difference observed in *RASSF1A* gene. An alteration of promoter methylation of *APC* gene according to tumor localisations was found ($p=0,003$) but there was no significant difference observed in *p16* and *RASSF1A* genes.

In our study, promoter hypermethylation which was considered to be occurred as an early event in gastrointestinal carcinogenesis was observed in *APC* and *p16* genes.

Keywords: MSP, Bisulfite modification, Tumor supressor genes, *APC*, *p16*, *RASSF1A*, Gastrointestinal tumors, Methylation

Advisor: Assoc.Prof. Hatice Mergen, Hacettepe University, Department of Biology, Molecular Biology Section

BU TEZ ÇALIŞMASI, GASTROİNTESTİNAL KANSERLİ HASTALARDA TÜMÖR BELİRTECİ OLARAK KULLANILMAK ÜZERE DOLAŞIMA KARIŞAN TÜMÖR HÜCRELERİNİN GEN İFADESİNİN VE METİLASYON PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI (PROJE NO: HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR BİRİMİ, 0901-601010) PROJESİ TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, hoşgörü ve ilgisiyle daima yanımda olan tez danışmanım Sayın Doç.Dr. Hatice Mergen'e,

Bilgi, tecrübe ve yardımları için sevgili hocalarım Dr. Ceren Acar, Arş.Gör.Dr. İ. Çağatay Karaaslan ve Uzm. Hasan Ünal'a,

Çalışmam sırasında her türlü yardım ve desteği için sevgili arkadaşım Arş.Gör. Sibel Küçükyıldırım'a,

Çalışmam için klinik desteği sağlayan Yrd.Doç.Dr. Zülfikar Polat'a,

Hayatımın her aşamasında, her koşulda yanımda olan sevgili aileme,

Göstermiş olduğu destek ve anlayış için sevgili arkadaşım bilim uzmanlığı öğrencisi Ceyda Ergil'e ve diğer tüm arkadaşlarıma,

En içten duygularımla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	4
2.1. Kanser Oluşumu.....	4
2.2. Epigenetik.....	8
2.2.1. Epigenetik Bir Değişiklik Olarak DNA Metilasyonu.....	10
2.2.1.1. DNA Metilasyonunu Gerçekleştiren Enzimler.....	11
2.2.1.2. DNA Metilasyonunun Genomdaki Yayılımı ve Görevi.....	13
2.2.1.2.1. Tümör Baskılayıcı Genlerin Promotor Bölgelerinin Metilasyonu.....	14
2.2.1.2.2. Global Genomik Hipometilasyon.....	15
2.2.2. Tez Çalışmasında Promotor Bölge Metilasyonu Araştırılan Genler....	16
2.2.2.1. <i>p16</i> (CDKN2A, Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2a) Geni.....	16
2.2.2.2. <i>APC</i> (Adenomatous polyposis coli) Geni.....	17
2.2.2.3. <i>RASSF1A</i> (Ras association domain family member 1A) Geni.....	18
2.3. Kanser Teşhisinde Promotor Hipermetilasyonunun Tümör Belirteci Olarak Kullanımı.....	18
2.3.1. DNA Metilasyonunun Belirlenmesinde Kullanılan Bisülfid Dönüşümü.....	20
3. MATERYAL VE METOT.....	23
3.1. Hasta ve Kontrol Örneklerinin Toplanması.....	23
3.2. Kandan ve Dokudan DNA İzolasyonu.....	24
3.3. Bisülfid Dönüşümü.....	25
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	26
3.4.1. Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MSP).....	27
3.5. PZR Ürünlerinin Agaroza Jel Elektroforezi ile Kontrolü.....	30
3.6. İstatistiksel Analizler.....	30

4.	SONUÇLAR.....	31
4.1.	Hasta ve Kontrol Bireylerinde <i>p16</i> , <i>APC</i> ve <i>RASSF1A</i> Genlerinin Promotor Bölgesi Metilasyonlarının Gösterilmesi	31
4.1.1.	Hasta ve Kontrol Bireylerinde <i>p16</i> Geninin Promotor Bölgesi Metilasyonunun Gösterilmesi.....	31
4.1.2.	Hasta ve Kontrol Bireylerinde <i>APC</i> Geninin Promotor Bölgesi Metilasyonunun Gösterilmesi.....	35
4.1.3.	Hasta ve Kontrol Bireylerinde <i>RASSF1A</i> Geninin Promotor Bölgesi Metilasyonunun Gösterilmesi.....	38
5.	TARTIŞMA.....	40
6.	KAYNAKLAR	46
EK	Etik Kurul İzni.....	50
	ÖZGEÇMİŞ.....	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Tümör oluşumunun klonal genişleme şeklinde meydana gelmesi	6
Şekil 2.2.	Birbirinden farklı olan genetik yollardaki aşamaların en son olarak bütün tümör tiplerinde ortak olan kanser hücrelerini meydana getirmesi	8
Şekil 2.3.	DNA metiltransferazlar ve demetilazlar tarafından gerçekleştirilen DNA metilasyonu	12
Şekil 2.4.	İnsan 9. kromozomu üzerinde <i>p16</i> geninin yerleşiminin gösterilmesi .	16
Şekil 2.5.	İnsan 5. kromozomu üzerinde <i>APC</i> geninin yerleşiminin gösterilmesi	17
Şekil 2.6.	İnsan 3. kromozomu üzerinde <i>RASSF1A</i> geninin yerleşiminin gösterilmesi.....	18
Şekil 2.7.	Bisüfit dönüşümünün şeması	21
Şekil 3.1	<i>APC</i> gen dizisi üzerinde primerlerin gösterilmesi.....	28
Şekil 3.2.	<i>p16</i> gen dizisi üzerinde primerlerin gösterilmesi	28
Şekil 3.3.	<i>RASSF1A</i> gen dizisi üzerinde primerlerin gösterilmesi.....	28
Şekil 4.1.	Hasta grubuna ait <i>p16</i> M amplifikasyon sonuçları	32
Şekil 4.2.	Hasta grubuna ait <i>p16</i> U amplifikasyon sonuçları.....	32
Şekil 4.3.	Kontrol grubuna ait <i>p16</i> M amplifikasyon sonuçları	32
Şekil 4.4.	Kontrol grubuna ait <i>p16</i> U amplifikasyon sonuçları.....	33
Şekil 4.5.	Hasta grubuna ait <i>APC</i> M amplifikasyon sonuçları	35
Şekil 4.6.	Hasta grubuna ait <i>APC</i> U amplifikasyon sonuçları	35
Şekil 4.7.	Kontrol grubuna ait <i>APC</i> M ve <i>APC</i> U amplifikasyon sonuçları	36
Şekil 4.8.	Hasta grubuna ait <i>RASSF1A</i> M amplifikasyon sonuçları	38
Şekil 4.9.	Hasta grubuna ait <i>RASSF1A</i> U amplifikasyon sonuçları	38
Şekil 4.10	Kontrol grubuna ait <i>RASSF1A</i> M amplifikasyon sonuçları	39
Şekil 4.11.	Kontrol grubuna ait <i>RASSF1A</i> U amplifikasyon sonuçları	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1.Hasta grubuna ait bireylerdeki tümör lokalizasyonları ve evreleri, bireylerin yaşları ve cinsiyetleri	23
Çizelge 3.2.Primer çiftlerinin dizileri, koşulları ve meydana getirdikleri ürün boyutları	29
Çizelge 4.1.Hasta ve kontrol grubu ile <i>p16</i> metilasyonu arasındaki farkın ki-kare testi ile karşılaştırılması ve <i>p</i> değeri	33
Çizelge 4.2.Mide ve kolorektal tümörler ile <i>p16</i> metilasyonu arasındaki farkın ki-kare testi ile karşılaştırılması ve <i>p</i> değeri	34
Çizelge 4.3.Hastaların bazı klinik ve patolojik özellikleri ile <i>p16</i> geninin promotor bölgesinin metillenme/metillenmeme durumu arasındaki farkın ki-kare testi ile karşılaştırılması ve <i>p</i> değerleri	34
Çizelge 4.4.Hasta ve kontrol grubu ile <i>APC</i> metilasyonu arasındaki farkın ki-kare testi ile karşılaştırılması ve <i>p</i> değeri	36
Çizelge 4.5.Mide ve kolorektal tümörler ile <i>APC</i> metilasyonu arasındaki farkın ki-kare testi ile karşılaştırılması ve <i>p</i> değeri	37
Çizelge 4.6.Hastaların bazı klinik ve patolojik özellikleri ile <i>APC</i> geninin promotor bölgesinin metillenme/metillenmeme durumu arasındaki farkın ki-kare testi ile karşılaştırılması ve <i>p</i> değerleri	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APC	Adenomatous polyposis coli
bç	Baz çifti
BRCA1	Breast cancer 1
CDKN2A	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
C-G	Sitozin-Guanin
-CH ₃	Metil grubu
CpG	Sitozin-Fosfat-Guanin
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	Deoksiribonükleik asit metiltransferaz
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetra-asetik asit
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MSP	Metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

NaCl	Sodyum klorür
nm	Nanometre
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
p14	Siklin bağımlı kinaz 2 ile ilişkili protein 2
p16	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
p53	p53 tümör proteini
RAR-β	Retinoik asit reseptör-beta
RASSF1A	Ras association domain family member 1A
rpm	Dakikadaki dönüş
SDS	Sodyum dodesil sülfat
T-A	Timin-Adenin
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
UV	Ultraviyole ışını
V	Volt
XPA	Xeroderma pigmentosum, complementation group A

1. GİRİŞ

Kanser, genomdaki dinamik değişiklikleri kapsayan bir hastalıktır (Hanahan and Weinberg, 2000). Bu olgu, normal olarak hücrelerin, vücutta nerede ve ne zaman çoğalması gerektiğini kontrol eden mekanizmalardaki hatalardan kaynaklanır ve insan popülasyonları arasında görülme sıklığı bakımından farklılıklar vardır (Weinberg, 2007).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 yılına ait verilerine göre dünya çapında kanserden ölen kişi sayısı 7,6 milyondur. Yani, Dünya'daki ölüm nedenlerinin %13'ü kanserdir. En çok ölüme neden olan kanser tipleri sırasıyla; akciğer, mide, karaciğer, kolorektal ve göğüs kanseridir (www.who.int). Türkiye'de ise 2004-2006 yılları arasında Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan araştırmaya göre, kadınlarda en çok görülen kanser tiplerinin başında göğüs kanseri gelirken, erkeklerde akciğer ve prostat kanserleri ilk sırada yer almaktadır. Kolorektal kanser ise en sık görülen üçüncü kanser tipidir (www.kanser.gov.tr).

Normal biyolojik süreçler (devamlı hücre bölünmesi gibi) kanser oluşum riski yarattığı için, farklı insan popülasyonlarında benzer sıklıkta kanser görülebileceği mantıklı gelebilir. Fakat, kanser insidansları çeşitli ülkelerde araştırılmış ve kanserli bireylerin sayısının bir popülasyondan diğerine değiştiği bulunmuştur (Arbeev et al., 2005). İnsan kanserlerinin 100 çeşidinden fazlası, insan popülasyonları arasında farklı frekanslara neden olan tümörlerden oluşur. Farklı insan popülasyonlarındaki kansere yatkınlık alelleri değişken olabilmektedir. Özgül kanserlerin göreceli olarak değişmez olan temel durumlarına ek olarak, bazı popülasyonlarda toplam kanser vakalarını artıran diğer faktörlerin de işe karıştığı görülmektedir. Kanser oluşumuna katkıda bulunan bu faktörler, kalıtım ve çevredir (Ponder, 2001). Genel anlamda çevre, vücudumuza giren hava ve suyu içerdiği gibi beslenme alışkanlıkları, eş seçimi ve tütün kullanımı gibi yaşam tarzını belirleyen durumları da kapsamaktadır (Neyhouser, 2004; Vineis and Husgafvel-Pursiainen, 2005).

Kanserin doğası karmaşıktır ve vücutta var olan biyolojik düzenin bozulmasıyla meydana gelir (Weinberg, 2007). Bu bozulmaya doğru giden tümör kitlesi birçok basamaktan geçmektedir. Basamaklar, tümör oluşumu için gerekli olan ve

neredeyse her tümör tipinin gelişmesinde rol alan hücresele olaylardır (Hanahan and Weinberg, 2000).

Tümör oluşumunda görev alan hücresele olaylardan bir tanesi de epigenetik modifikasyonlardır. Bu modifikasyonlar, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik meydana getirmeden DNA'nın fonksiyonlarını değiştiren ve kalıtsal olarak aktarılabilen olaylardır (Sharma et al., 2010). Histon modifikasyonları, translasyon sonrası modifikasyonlar ve DNA metilasyonu başlıca epigenetik olaylardır (Schwab, 2008).

Bir tümör hücresinin çoğalıp tümör kitlesini oluşturup gözle görülür bir hal almasından çok daha önce DNA metilasyonunda değişiklikler meydana gelmektedir (Vogelstein and Kinzler, 2004). Hücrenin tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen hipermetilasyon, ilgili genlerin fonksiyonunu baskılayabilmektedir (Sayın, 2008). Yapılan son çalışmalarda, kanser teşhisi için biyopsi örneği alınmasından çok daha önce, hücresele boyutta meydana gelen DNA metilasyon değişikliklerinden yararlanılmıştır (Azuara et al., 2010).

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de en sık görülen kanser tiplerinden biri olan gastrointestinal sistemde meydana gelen kanser, sindirim sisteminde yer alan bazı hücrelerin tümör kitlesine dönüşmesiyle oluşmaktadır. Sindirim sisteminde bulunan epitel doku hücreleri belirli bölgelerde sayıca artarak benign (iyi huylu) yapılar oluşturabilirler (Weinberg, 2007). Genlerde meydana gelen mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler, benign yapıların malign (kötü huylu) yapıya dönüşmesinde görev alırlar. Epigenetik değişikliklerden biri olan DNA metilasyonunun belirlenmesi kanserin erken teşhisi için oldukça önemlidir.

Yapılan çalışmalarda, tümör oluşumu sırasında promotor metilasyonuna uğrayan birçok tümör baskılayıcı gen bulunmuştur ve bu genlerin çoğunun, farklı kanser tiplerindeki metilasyon profilleri ortaya çıkarılmıştır (Xu et al., 2004). *APC*, *p16* gibi tümör baskılayıcı genlerin promotorlarının metillenmesi çoğu kanser tipinde ortak olarak görülürken, bazı tümör baskılayıcı genlerin promotorları ise sadece belirli tümör tiplerinde metilasyona uğramaktadır (Laird and Jaenisch, 1996).

DNA metilasyonunu belirlemek için birçok metot kullanılmaktadır. Seçilen yöntem araştırılan metilasyon düzeyine ve profiline göre değişmektedir. Restriksiyon endonükleazlarla kesim, PZR ve bisüfit dönüşümü bu yöntemlerden birkaçıdır (Oakeley, 1999; Laird, 2003).

Tez çalışmasında, gastrointestinal tümörlerinde sıklıkla promotor hipermetilasyonuna uğradığı düşünülen *APC*, *p16* ve *RASSF1A* genleri, Metilasyona Özgü Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MSP) tekniği ile çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Kanser Oluşumu

Tümör oluşumu, hücrenin çoğalmasını ve hayatta kalmasını kontrol eden genlerle, malignant hücre fenotipine neden olan diğer kalıtsal özellikleri kontrol eden genleri etkileyen bir dizi, rasgele meydana gelen mutasyonlar ve DNA'nın epigenetik değişimleri tarafından yönlendirilir (Weinberg, 2007).

Tümör oluşumu genellikle yıllarca süren karmaşık bir süreçtir. Epidemiyolojik çalışmalar, kanser insidansında yaşın çok önemli bir faktör olduğunu göstermiştir. Tümör oluşumuna katkıda bulunan birçok olay, yaşla beraber hücrenin malignant fenotipe dönüşmesini sağlayacak olan özellikleri biriktirir. Bu yüzden yaşa bağlı olarak kanser insidansı artmaktadır (Schulz, 2005). Ailesel kanserler dışında meydana gelen sporadik kanserlerin, yaşla birlikte meydana gelme olasılığı artmaktadır (Finkel et al., 2007).

Bir hücrenin kansere dönüşmesi için aslında birçok değişikliği bir arada bulundurması gerekmektedir. Bu değişikliklerin sayısı oldukça fazladır ama temel farklılıkları göz önünde bulundurarak bir sıralama yapıldığında, malignant büyümenin olması için hücrenin;

- büyüme sinyalleri bakımından kendi kendine yetebilmesi,
- büyümeyi inhibe eden sinyallere karşı duyarsızlaşması,
- programlanmış hücre ölümünden (apoptozis) kaçması,
- sınırsız çoğalma potansiyeline sahip olması,
- çevresindeki anjiyogenezi aralıksız sürdürmesi,
- doku invazyonu ve metastaz yapabilmesi gerekmektedir.

Bu özellikler hemen hemen bütün insan tümör tiplerinde ortaktır (Hanahan and Weinberg, 2000).

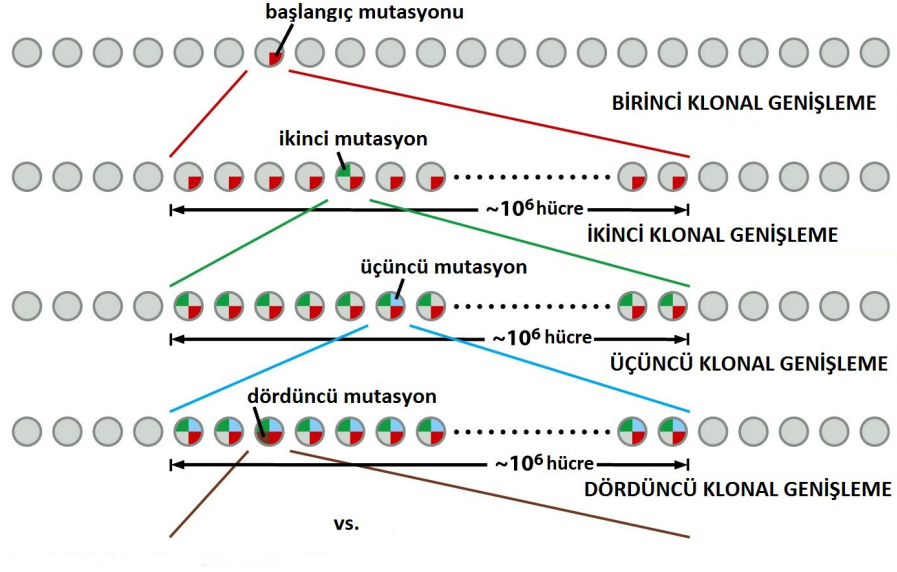
Kanser oluşumu sırasında hücrede meydana gelen değişikliklerden sorumlu olan iki gen sınıfı bulunmaktadır. Bunlar proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı

genlerdir. Proto-onkogenler, mutasyonla aktif karsinojenik özellik kazanan genlerdir ve mutant halleri onkogen olarak adlandırılmaktadır. Proto-onkogenlerin tek kopyasındaki değişiklik, kanser oluşması için yeterlidir. Tümör baskılayıcı genler ise hücre döngüsünün negatif düzenleyicileri olarak iş görürler. Proto-onkogenlerin tam tersine kanser oluşumunda tümör baskılayıcı genlerin inaktif olması gerekmektedir. Tümör baskılayıcı genin işlevini kaybetmesi için her iki allelinin de mutasyona uğraması gerekmektedir (Weinberg, 2007).

Kanser oluşumunda, genetik ve epigenetik değişimler de birbirlerini etkileyerek ve birbirlerine tepki vererek, hücrenin malign hale gelmesini belirleyen bir dizi değişiklik meydana getirirler. Epigenetik değişimlerin kanser oluşumuna etkileri son yıllarda en çok araştırılan konulardan biridir (Schulz, 2005).

DNA metilasyonu epigenetik bir değişimdir. Proto-onkogenlerde meydana gelen hipometilasyon normalde metillenmiş genlerdeki baskının ortadan kalkmasına neden olup, istenmeyen bir zamanda ifade olmasını sağlayabilir. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen hipermetilasyon ise, normalde ifade olan bir genin baskılanmasına neden olabilir. DNA'da meydana gelen bu durumlar, hücrenin tümör oluşumuna doğru yol almasını tetikler (Sayın, 2008).

Önceki yıllarda, tümör gelişiminin Darwin evrimine benzer şekildeki biyolojik süreçlerden geçtiği belirtilmiştir. İnsanlardaki kolon kanserinin ilerleyişı ile ilgili analizler bu modeli destekleyen kanıtlar sağlamıştır. Tür içindeki bir bireyin diğerleriyle yarışına benzer şekilde, kanser gelişiminde de değişen birimler hücrelerdir ve hücre popülasyonu içerisinde her bir hücre diğeriyle yarış halindedir. Darwin evriminin modern tarifindeki gibi, rasgele mutasyonların hücre popülasyonu içerisinde genetik çeşitlilik meydana getirdiği varsayılmaktadır. Genetik heterojenliğe sahip bir popülasyon meydana geldiğinde seçim güçleri, özellikle yaşadığı dokunun mikroçevresinde çoğalabilmesini ve hayatta kalabilmesini sağlayan özellikler başta olmak üzere avantaj sağlayan mutant alelleri taşıyan hücrelerin büyümesini destekleyebilir (Stratton et al., 2009).



Şekil 2.1. Tümör oluşumunun “*klonal genişleme*” şeklinde meydana gelmesi (Hanahan and Weinberg, 2000).

Araştırmacılar Darwin teorisini ve çok aşamalı tümör oluşum varsayımını birleştirerek tümör oluşumunu, “*klonal genişleme modeli*” olarak tanımlamışlardır (Weinberg, 2007; Vineis and Berwick, 2006) (Şekil 2.1). Bu modelde, önce rasgele bir mutasyon, büyüme ve/veya hayatta kalma bakımından kısmi avantaj sağlayan kalıtsal özelliklere sahip olan hücreleri meydana getirir. Sonra bu ve bunun soyundan meydana gelen hücreler etraftaki hücrelerden daha hızlı bir şekilde çoğalırlar ve sonunda dokuda baskın hale gelen geniş klonal populasyon meydana gelir ve çevredeki genetik olarak daha az desteklenen hücreler sıkıştırılarak sonunda bu hücre klonu diğer bir avantajlı mutasyonla yeterli büyüklüğe erişir (10^6 hücre gibi). 10^6 hücrede bir bozukluk yaratabilen avantajlı mutasyon, bu klonal popülasyonda bulunan herhangi bir hücrede olası bir şekilde meydana gelebilir. 10^6 klonal hücre topluluğundaki hücrelerden daha etkin bir şekilde çoğalacak (ya da hayatta kalacak) olan ikinci mutasyona sahip hücre, bölgesel doku çevresinde baskın olup genişler, öncüllerini geride bırakarak yeni bir alt klon meydana getirir. İki mutasyona sahip olan hücre önceki gibi yeterli büyüklüğe eriştikten sonra üçüncü mutasyon meydana gelebilir ve böylece klonun genişlemesi ve başarısı tekrar eder. Her biri özgül bir mutasyon tarafından tetiklenen 4-6 klonal zincir dizisi

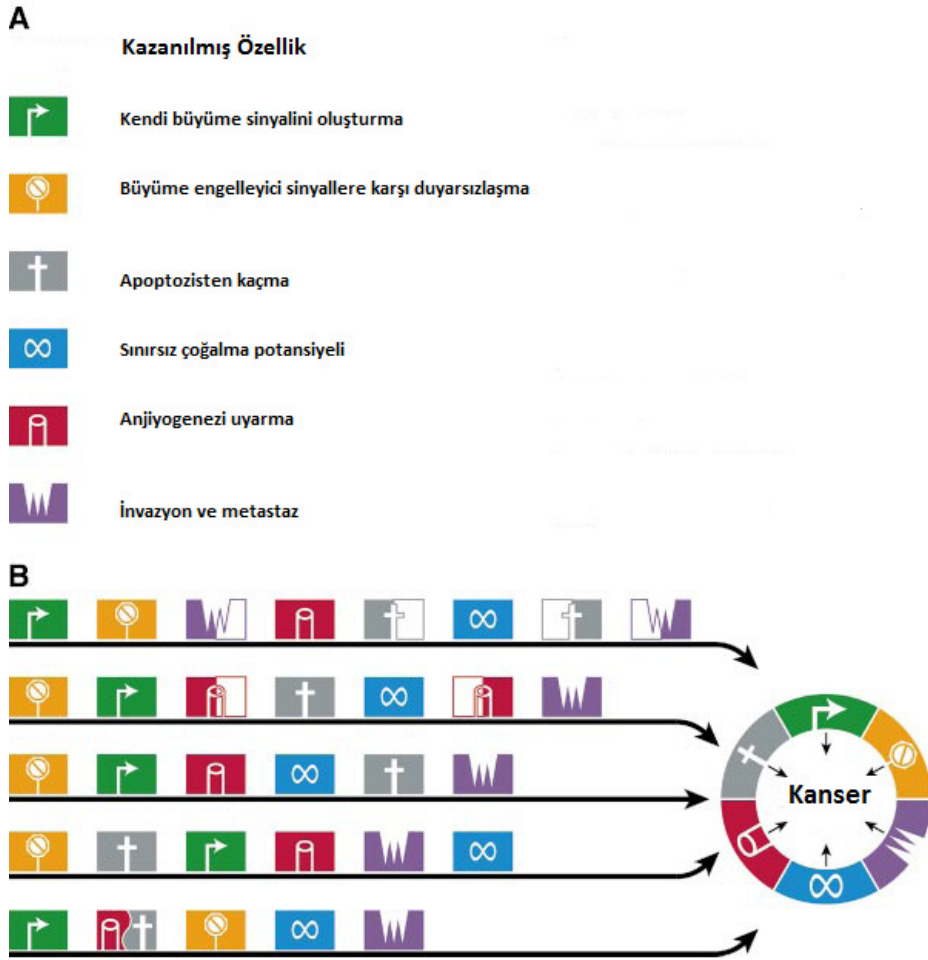
kanser ilerleyişinin hücresel ve genetik seviyede nasıl olduğunu açıklamaktadır (Weinberg, 2007; Vineis and Berwick, 2006).

Gastrointestinal sistemde meydana gelen tümörlerin gelişimi boyunca somatik mutasyonlar ve metilasyon olayları, epitel hücrelerinin bozulmamış haldeki genomlarını hızlı bir şekilde değiştirerek malignant hücrelerde bulunan bozulmuş genomlara dönüştürürler (Wong et al., 2007).

Epitel hücreleri tümör gelişimi boyunca neoplastik fenotiplerini artırır, bununla bağlantılı olarak genomlarında da değişime uğramış genetik lokus sayısı artar. Kanser oluşumu sırasında proto-onkogenlerin onkogene dönüşümünde ve en az üç tane farklı tümör baskılayıcı genin inaktif hale gelmesinde rol alan değişimlerin hepsi eşit öneme sahiptir (Weinberg, 2007).

Çoğu dokuda meydana gelen tümör gelişimi derecelerini yöneten süreçler hakkında neredeyse hiçbir şey bilinmemektedir. Gastrointestinal tümörlerde, beslenmenin belirli elemanları epitel hücrelerinin genomlarında mutasyon birikmesini artırabilir (Bozetti et al., 2007). Bu şekildeki mutasyon oranının artışı klonal ilerleme zamanlarının arasını azaltacaktır. Belki de bazı besinleri tüketen bireylerde klonal yayılma evrelerinin arasındaki zaman normalde 10 ila 20 yıl iken, 5 yıl ya da daha kısa bir süre olacaktır. Sonuç olarak, hastalık süreci genellikle tamamlanana kadar bir insan ömrü yani 30 ya da 40 yıl geçmektedir (Weinberg, 2007).

Hücrelerin malignant yapıya dönüşürken izledikleri yollar oldukça farklıdır. Belirli onkogenlerdeki ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyon, tümörün ilerleme yollarında bazen erken evrelerde bazen de geç zamanlarda ortaya çıkabilir. Sonuç olarak apoptozise direnç, anjiyogenezi sürdürme ve sınırsız çoğalma gibi biyolojik özelliklerin kazanılması tümör oluşumunun farklı zamanlarında görülebilir. Ayrıca bu özelliklerin oluşum sıraları da hem aynı, hem de farklı tümör tiplerinde farklılık gösterebilir (Şekil 2.2). Bazı tümörlerde özgül bir genetik olay sadece bir özelliği meydana getirebilir veya bu olay farklı özelliklerin aynı anda meydana gelmesini sağlayabilir. Bu genetik yollardaki aşamalar birbirlerinden ne kadar farklı da olsa en son erişilen biyolojik nokta (kanserin en önemli özellikleri) bütün tümör tiplerinde ortak olarak paylaşılır (Hanahan and Weinberg, 2000).



Şekil 2.2. Birbirinden farklı olan genetik yollardaki aşamaların en son olarak bütün tümör tiplerinde ortak olan kanser hücrelerini meydana getirmesi (Hanahan and Weinberg, 2000).

2.2. Epigenetik

Epigenetik, DNA dizisinde değişiklik olmadan genom fonksiyonunda meydana gelen kalıtsal değişikliklerdir (Schwab, 2008). Ökaryotik hücrelerin farklılaşmasında epigenetik değişiklikler görev alır. Morfogenez boyunca totipotent kök hücreler pluripotent kök hücreleri meydana getirir ve daha sonra tamamen farklılaşmış hücreler oluşur. Yani zigot, seri halindeki hücre bölünmeleri sonunda sinir hücresi, kas hücresi, epitel hücre gibi birçok hücreyi oluşturur ve bunu bazı genlerin ifadesini artırarak, bazı genlerin ifadesini de baskılayarak gerçekleştirir. Günümüzde epigenetik terimi birçok mekanizmayı içermektedir. Bunlar transkripsiyon sonrası modifikasyonlar, nükleozom yapısının değişikliğiyle meydana

gelen kromatin yapısının yeniden şekillenmesi ve kodlanmayan mikro RNA'ların katıldığı mekanizmalar gibi olaylardır (Allis et al., 2007).

Epigenetik terimi ilk kez 1942 yılında C. H. Waddington tarafından kullanılmıştır ve genetik ile *epigenesis* kelimelerinin birleşiminden oluşur (Waddington, 1942). *Epigenesis* eski bir kelimedir ve embriyonik gelişim boyunca totipotent hücrelerin farklılaşmış hücrelere dönüşmesini tanımlamaktadır (Holliday, 2006).

DNA, çekirdek içerisinde histon proteinleri ile birlikte nükleozom birimlerini oluşturur ve böylece genetik materyal, düzenli bir şekilde paketlenerek kromatin yapısı meydana gelir. Kromatin yapısında kovalent ve kovalent olmayan modifikasyonlar gerçekleşir. Yüksek yapılı ökaryotların çoğunda ise DNA'nın kendi kendini kovalent olarak değiştirmesi mümkündür. Bunu sitozin bazlarının metilasyonu ile gerçekleştirir. Bu mekanizmaların hepsi birbiriyle iç içe geçmiş yolları içerir ve kromatin yapısındaki varyasyonları oluşturur. Bu nedenle tamamen aynı oldukları düşünülen tek yumurta ikizlerini birbirinden ayıran moleküler mekanizmalar epigenetiğin bir ürünüdür (Schwab, 2008).

Epigenetiğin moleküler temeli karmaşıktır ve son yıllarda en çok çalışılan konulardan bir tanesi olmuştur. Bazı genlerin ifadesinin kontrolü epigenetiğin görevidir ve bunu DNA'nın temel yapısını değiştirerek değil, DNA ile bağlantılı olan kromatin proteinlerini ya da DNA'yı etkileyerek gerçekleştirir. Yani epigenetik, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşmasını engelleyecek mekanik değişiklikler yaratarak gen ifadesini kontrol eder. Bu mekanik etki, geri dönüşümlü olması açısından DNA dizisinde gözlenen mutasyonlardan farklılık gösterir. Farklılaşmış olan hücrelerin bütün bir genomu içerip sadece kendisi için gerekli olan genleri aktifleştirip diğerlerini sessizleştirmesi epigenetik mekanizmalarla açıklanabilir (Allis et al., 2007).

Epigenetik süreçler, baskılama, gen sessizleşmesi, X kromozomunun inaktifleşmesi, kanser oluşum süreci, histon modifikasyonları, heterokromatin yapının düzenlenmesi ve DNA metilasyonu gibi birçok olayı kapsar (Sayın, 2008).

2.2.1. Epigenetik Bir Değişiklik Olarak DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, gen baskılanmasıyla bağlantılı olan bir mekanizmadır. Metilasyon, mantarlar dışındaki bütün ökaryotların genomunda değişen sıklıklarda meydana gelmektedir ve ökaryotlardaki metilasyon, yüksek organizasyonlu canlılarda çeşitli fonksiyonların meydana gelmesini sağlayan evrimsel bir araçtır (Weinberg, 2007; Colot and Rossignol, 1999). Bu modifikasyon ile DNA kalıbındaki sitozin rezidularına metil gruplarının eklenmesi sonucu 5-metil sitozin meydana gelir. Genomda metillenmiş DNA, sentromerik tekrarlar, satelit dizileri ve tekrarlayan elementlerde oldukça yaygındır ancak aktif genlerde bulunmamaktadır. DNA metilasyonu memeli genomunda transkripsiyonel baskılama, kromatin yapının değiştirilmesi, X kromozomu inaktivasyonu, genomik baskılama, tekrarlayan ve parazitik DNA dizilerinin baskılanması gibi önemli etkilere sahiptir (Sayın, 2008). Yüksek yapıli ökaryotların genomunda kodlama yapmayan bölgeler ve tekrarlayan DNA dizilerinin artışı ile DNA metilasyonu seviyesinin artışı arasında pozitif bir ilişki vardır. Deneysel sonuçlar DNA metilasyonunun yabancı kökenli bir genomu (sıçrayan elementler, viral diziler ve diğer tekrarlayan diziler gibi) sessizleştirmek için kullanılan bir çeşit savunma mekanizması olduğunu göstermiştir (Laird and Jaenisch, 1996).

DNA metilasyonu kovalent kimyasal bir modifikasyondur ve sitozin halkasının 5. pozisyonundaki karbon atomuna bir metil grubunun (-CH₃) eklenmesiyle gerçekleşir. Normalde DNA'da bulunan sitozin, en sık gözlenen mutasyon mekanizmalarından biri olan deaminasyon sonucu urasile dönüşür ve bir RNA bazı olması nedeniyle onarım mekanizmalarınca (urasil glikozilazlar) tanınarak onarılır. Buna karşılık metilsitozinin kendiliğinden deaminasyonu sonucu oluşan timin, normalde de DNA'da bulunan bir baz olduğu için onarım mekanizmalarından kaçır. Böylece başlangıçta DNA çift zincirinde bulunan C-G ikilisi T-A ikilisine dönüşür (Sayın, 2008).

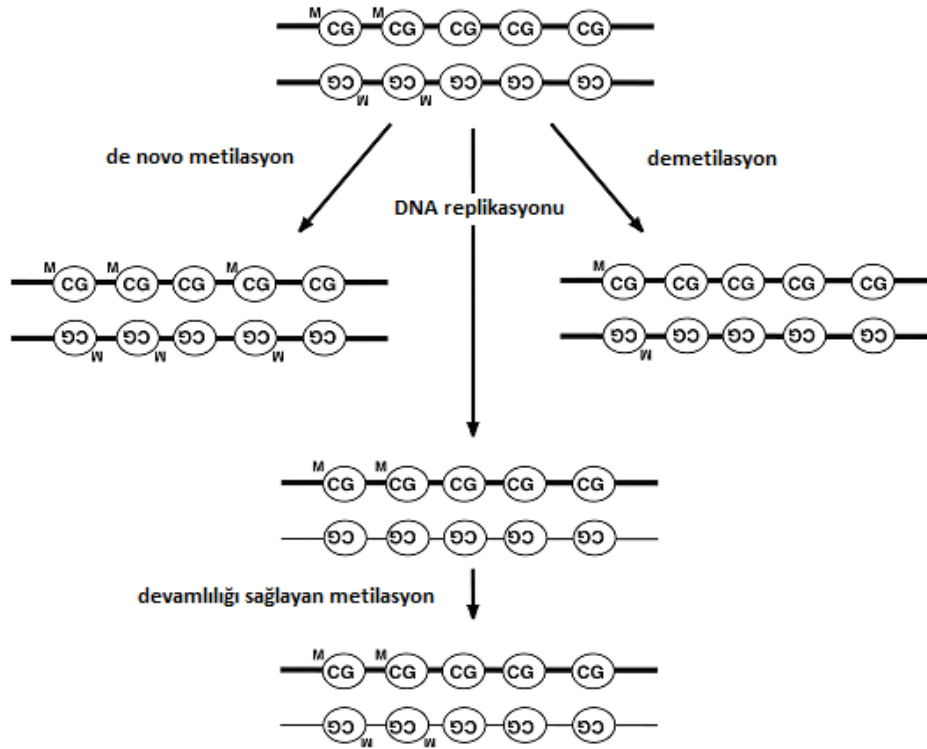
Sitozin metilasyonunun çoğu 5-metil sitozin (CpG) içeren dizilerde meydana gelmesine rağmen, bazıları da CpA ve CpT dinükleotitlerinde meydana gelir. İnsan genomu sürekli olarak aynı bölgelerden metillenmez. Metillenmiş bölgeler arasında metillenmemiş segmentler içerir. Genomun diğer kısımlarının tersine

CpG adaları olarak adlandırılan küçük DNA bölgelerinin boyutu 0,5-5 kb arasında değişir ve her 100 kb'da bir bulunur. İnsandaki genlerin yaklaşık yarısında CpG adaları bulunmakta ve bunlar hem housekeeping genlerde hem de dokuya özgü genlerde yer almaktadır (Das and Singal, 2004).

2.2.1.1. DNA Metilasyonunu Gerçekleştiren Enzimler

DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar (DNMT) olarak bilinen bir grup enzim tarafından oluşturulmaktadır (Şekil 2.3). Bugüne kadar bilinen DNMT'ler izoformlarıyla birlikte DNMT1, DNMT1b, DNMT1o, DNMT1p, DNMT2, DNMT3A, DNMT3b ve ayrıca DNMT3L'dir. Metilasyon *de novo* (her iki DNA zincirindeki CpG dinükleotitleri metillenmemiş) ya da devamlılık şeklinde (bir zincirdeki CpG dinükleotitleri metillenmiş) olabilir. DNMT1 hem *de novo* hem de devamlılığı sağlayan metiltransferaz aktivitesine sahiptir ve DNMT3A ile DNMT3b güçlü *de novo* metiltransferazlardır. Bu enzimlerin önemi bazı hayvan deneylerinde gösterilmiştir. Bu genlere sahip olmayan bir fare, gelişimin erken evrelerinde ya da doğumdan hemen sonra ölmektedir (Das and Singal, 2004).

DNMT'lere ilave olarak metilasyon mekanizmalarında görev alan önemli bir enzim grubu da demetilazlardır (Şekil 2.3). Embriyogenezin erken evrelerinde ve gelişim boyunca meydana gelen DNA metilasyon profili yayınlanmıştır. DNA'daki metilasyonu aktif olarak ortadan kaldıran enzimler 5-metil sitozin glikozilaz ve MBD2b'dir. 5-metil sitozin glikozilaz DNA'daki metillenmiş sitozinleri keser, DNA tamir mekanizması sitozini nükleotit formunda tekrar takar. MBD2b (metil-CpG-binding domain 2) ise bir izoformdur. MBD2b, glikosilaz ya da nükleaz aktivitesi içermez ve 5-metil sitozini, sitozin ve metanole hidrolize ederek demetilasyona neden olduğu düşünülmektedir (Jaenisch and Bird, 2003).



Şekil 2.3. DNA metiltransferazlar ve demetilazlar tarafından gerçekleştirilen DNA metilasyonu (Aguirre-Arteta, 2000).

Hücrenin metilasyon profili gelişim boyunca mükemmel bir şekilde kontrol edilir. Metilasyon profili, devamlılığı sağlayan metiltransferaz aktivitesi yoluyla DNA replikasyonu boyunca yavru DNA zincirine aktarılır. Döllenmeden sonraki ilk birkaç hücre bölünmesinde atasal DNA'nın başlangıç olarak demetilasyonu ve bunu takiben 8 hücreli evre ile blastosistin implantasyonuna kadar geçen sürede özgül CpG bölgelerinin *de novo* metilasyonu ile metilasyon profilleri erken embriyoda belirlenir. İlk başlarda metilasyon motiflerinin bir seferde belirlendiği ve büyük bir doğrulukla her hücre bölünmesinde sürdürüldüğü düşünülmüştü, ama genomik dizilemenin ortaya çıkmasıyla her bir CpG bölgesinin metilasyon durumunun her zaman sürdürülmediği açıklığa kavuşmuştur. Her hücre bölünmesindeki *de novo* metilasyon ile demetilasyon arasındaki açık etkileşim, her bir molekül için heterojen metilasyon motifi ortaya çıkarır, fakat bir bölge içindeki her bir CpG kısmında heterojenite olabilmesine rağmen erken embriyoda metillenen asıl DNA bölgesi ortaktır (Clark and Melki, 2002).

2.2.1.2. DNA Metilasyonunun Genomdaki Yayılımı ve Görevi

Gelişimin erken döneminde meydana gelen global DNA metilasyonu değişiklikleri ile beraber metilasyon profillerinde bölgeye özgü farklılıklar da meydana gelir. Aslında erken embriyoda bütün CpG bölgeleri metilasyona duyarlı değildir. CpG metilasyonuna göre genom farklı bölgelere ayrılır. Metillenmemiş bölgeler aktif gen bölgeleri iken, metilli bölgeler inaktif halde olan genlerden oluşur. CpG adaları, genomda bulunan CpG dinükleotitlerinden yaklaşık 5 kat daha fazla CpG dinükleotiti içerir ve bu bütün genoma oranlanırsa %1-2'yi oluşturur. 200 baz çifti ile birkaç kilo baz uzunluğundadırlar, çoğu housekeeping genin promotoru ve ilk birkaç ekzonunu içine alacak şekilde yayılım gösterirler. Genomda 29000 CpG adası olduğu ve bütün genlerin yaklaşık %50-60'nın promotorla bağlantılı adaya sahip olduğu kabul edilmektedir. Erken embriyoda çoğu CpG adası metilasyondan korunmasına rağmen, bazı CpG adaları farklı alelik metilasyona uğrarlar. Mesela inaktif X kromozomu üzerindeki CpG adaları ve birçok baskılanmış gendeki CpG adaları farklı bir şekilde metillenmişlerdir. Bu yüzden bir hücredeki DNA metilasyon profili her bir dizi için düzgün bir şekilde düzenlenir (Clark and Melki, 2002).

Memelilerdeki DNA metilasyonunun en önemli rollerinden birinin gen ifadesini düzenlemek olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden promotor ve enhansır gibi gendeki düzenleyici bölgelerdeki metilasyon genellikle genin fonksiyonunu baskılar. Örnek olarak, *in vitro* şartlarda çoğu promotor bölge metillenmiştir. Metilasyonla tetiklenen baskılamının, ya transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engellediği ya da inaktif kromatin yapısı oluşturduğu düşünülmektedir (Clark and Melki, 2002).

DNA metilasyonu gen transkripsiyonunun önemli bir düzenleyicisidir ve tümör oluşumundaki rolü son yıllarda çok ilgi görmüştür. DNA metilasyonundaki değişim, gelişimde olduğu gibi birçok tümör tipinde de sıklıkla meydana gelmektedir. Normal hücredeki DNA metilasyonunun mükemmel epigenetik dengesi, kanser hücresinde hızla bozulur (Esteller, 2005).

DNA metilasyon anormallikleri, tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgesinde bulunan CpG adalarının metillenerek transkripsiyonel olarak sessizleştirilmesi ve

genomdaki geniş bir alanı etkileyen genomik hipometilasyon olmak üzere iki kategori halinde incelenebilir (Esteller, 2005).

2.2.1.2.1. Tümör Baskılayıcı Genlerin Promotor Bölgelerinin Metilasyonu

Tümör baskılayıcı genin hipermetilasyonu, gen ifadesini baskılayan epigenetik bir mekanizmadır ve ilk kez sporadik insan retinoblastomasına neden olan *RB* geninde rapor edilmiştir. Retinoblastomalı hastaların dahil edildiği bir metilasyon çalışmasında, *RB* geninin promotor bölgesinde yer alan CpG adasının, çoğu hastada metillenmiş olduğu belirtilmiştir (Laird and Jaenisch, 1996).

Literatürdeki başka bir çalışmada ise, kolon kanseri hastası olan 50 bireyden 20'sinde (%40), *p16* geninin promotor bölgesinde metilasyon gözlenmiş ve kolorektal tümörlerde sıklıkla *p16* geninin metilasyona uğradığı sonucuna varılmıştır (Goto et al., 2009).

İnsan tümörlerinde bazı CpG adaları metillenir ve ilişkili olan genin ifadesi kapatılır. Eğer bu anormallik tümör baskılayıcı geni etkiliyorsa hücreye seçici bir avantaj sağlayabilir ve bu özellik jenerasyonlar boyunca seçilebilir. Kanser hücrelerinde, hücre döngüsü inhibitörü olan *p16 geni*, *p53* regülatörü olan *p14 geni*, DNA tamir genlerinden olan *BRCA1* ve *MGMT* genleri gibi kanser patolojisi ile ilişkili pek çok gen, metilasyon mekanizmasıyla sessizleşmeye maruz kalır. İnsan kanserlerinde hipermetilasyona uğrayan genlerin çoğu tanımlanmış olup, bu epigenetik değişikliklerin insan kanserlerindeki bütün hücresel yolları etkileyen ortak bir özellik olduğu düşünülmektedir (Esteller, 2005).

Genlerin CpG adalarının metilasyonu tümör tipine göre değişmektedir. Örneğin, her bir tümör tipinin kendine özgü CpG adası metilasyon profili (metilotip) vardır (Esteller, 2003). Bu profil, genetik ve sitogenetik belirteçlerde olduğu gibi belirli tümörlerde benzer özellikler gösterir. DNA metilotipi, tümörlerin agresifliklerine veya kemoterapiye hassasiyetlerine göre sınıflandırmada kullanışlı olabilir (Esteller, 2005).

Birçok tümör bir ya da birkaç gende birkaç çeşit hipermetilasyon gösterebilir. En kapsamlı çalışmalardan bir tanesi akciğer kanserinde yapılmış ve 40'tan fazla

genin DNA metilasyon motifinde değişimler bulunmuştur. Oldukça sık olarak hipermetilasyona uğrayan genlerin *RAR-β*, *RASSF1A*, *CDNK2A*, *CHD13* ve *APC* olduğu görölmüştür (Das and Singal, 2004). Bazı tümör tiplerinde, genlerin metilasyona uğrama sıklığı diğer tümörlerden daha fazla olmaktadır. Örneğin, gastrointestinal sistemde (özefagus, mide, kolon) meydana gelen tümör tiplerinde metillenmiş genler daha fazla görülürken rahim kanserinde genlerin metilasyona uğrama sıklığı daha azdır (Esteller, 2003).

2.2.1.2.2. Global Genomik Hipometilasyon

Hipometilasyon, hipermetilasyon mekanizmasının tersine, metillenmiş DNA bölgelerindeki metil gruplarının uzaklaştırılmasıdır. CpG adaları yerine, bütün genom boyunca meydana gelen bir reaksiyondur (Esteller, 2005).

Kanser hücrelerinde CpG adaları hipermetile olmaya başladığında, genom boyunca global hipometilasyon da meydana gelir. Malignant bir hücre, normalden %20-60 daha az 5-metil sitozin içerebilir. Metil gruplarının kaybı, genlerin intron ve ekzon bölgelerinin hipometilasyonu ve insan genomunun %20-30'unu oluşturan tekrarlayan DNA dizilerinin demetilasyonu ile olur. Global DNA hipometilasyonu kanser oluşumunu üç mekanizma ile tetikleyebilir. Bunlar; kromozomal kararsızlık, sıçrayan elementlerin yeniden aktif hale geçmesi ve baskılanmanın kalkmasıdır. DNA metilasyonunun azalması, heterozigotluk kaybına neden olan mitotik rekombinasyonu desteklediği gibi karyotipik olarak belirlenebilen yeniden düzenlenmeleri de iletir. Ayrıca, sentromerik dizilerdeki yoğun demetilasyon insan tümörlerinde ortaktır ve anöploidide rol alabilir. Bunun bir kanıtı olarak; eşey hücrelerindeki DNMT3b geninde mutasyonlar taşıyan hastalarda çok sayıda kromozom anormalliklerinin olması gösterilir. Malignant hücre DNA'sının hipometilasyonu, L1 (LINE) ve Alu tekrarları gibi genom içindeki parazitik DNA dizilerini aktif hale getirebilir. Metil grubunun kaybı, baskılanmış genleri ve kadınlardaki X kromozomundaki genleri de etkileyebilir (Esteller, 2005).

Uzun yayılmış nükleer elementler insan genomunda en çok bulunan hareketli DNA'lar ya da retrotranspozonlardır. Bu hareketli DNA'lardaki hipometilasyon

transkripsiyonel aktivasyona neden olur ve birçok kanser tipinde bulunmaktadır. Hareketli DNA'nın hipometilasyonu ona bağlı olan genin ifadesinde de bir bozukluk yaratabilir (Das and Singal, 2004).

Global hipometilasyon birçok kanser tipinde (göğüs, servikal, beyin) görülmektedir ve tümörün evresiyle birlikte artış göstermektedir (Das and Singal, 2004).

2.2.2. Tez Çalışmasında Promotor Bölge Metilasyonu Araştırılan Genler

2.2.2.1. *p16* (*CDKN2A*, Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A) Geni

p16 geni 9. kromozomun p21.3 bölgesinde yer almakta (Şekil 2.3) ve hücre döngüsünü inhibe eden 156 aminoasitten oluşan 16 kDa'luk bir proteini kodlamaktadır. Siklin bağımlı kinazlar (CDK 4 ve 6) ile siklin D'nin oluşturduğu komplekse bağlanarak anormal hücre büyümesini ve çoğalmasını baskılar. Bu bağlanma sonucu enzimin kinaz aktivitesi inhibe olur ve hücre döngüsü G1 fazında durur.



Şekil 2.4. İnsan 9. kromozomu üzerinde *p16* geninin yerleşiminin gösterilmesi (www.ensembl.org).

Mutant olan *p16*, kararlı bir kompleks oluşturamaz ve bu yüzden uygun olmayan mitotik bölünmeleri etkin bir şekilde inhibe edemez. Bu proteinin hücre döngüsü düzenleyicisi olmasındaki önemi, *p16* geninde mutasyona sahip olan birçok tümör tipinde gözlemlenmiştir (Foulkes et al., 1997).

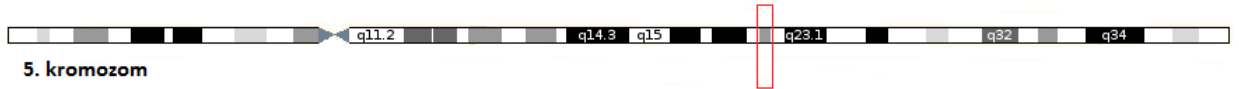
p16 geninin promotor bölgesinin metilasyon sıklığı, kolon kanserlerinde oldukça yüksek bulunmuştur (Goto et al., 2009). Kolorektal tümörü olan 21 hastanın 9'unda (%42,9) *p16* geninin promotor bölgesinin metillenmiş ve metilasyonun yüksek

olduğu dokularda *p16* ifadesinin düşük olduğu rapor edilmiştir (Kim et al., 2005). Akciğer kanseri olan 74 hastada yapılan bir çalışmada ise 59 hastanın (%73) *p16* geninde metilasyon bulunduğu belirtilmiştir (Guzman et al., 2007).

2.2.2.2. APC (Adenomatous polyposis coli) Geni

APC geni, hücrenin tümör kitlesini oluştururken geçirdiği hücresel olaylarda kritik rol oynayan APC proteinini ifade eder.

Beşinci kromozomun uzun kolunda (q) 21 ile 22 pozisyonları arasında bulunan *APC* geni tümör baskılayıcıdır (Şekil 2.4) ve hücre döngüsünü, hücrelerin çok hızlı veya kontrolsüz bir şekilde büyümesini ve bölünmesini engelleyerek düzenler.



Şekil 2.5. İnsan 5. kromozomu üzerinden *APC* geninin yerleşiminin gösterilmesi (www.ensembl.org).

APC proteini hücrenin, ne kadar sıklıkta bölüneceğini, doku içerisinde diğer hücrelere nasıl bağlanacağını ve doku içinde veya doku dışına hareket etmesini kontrol eder. Bu proteinin diğer bir görevi de hücre bölünmesi sonrasında kromozom sayılarının doğruluğunu kontrol etmektir. *APC* proteini bu görevlerinin çoğunu, hücre bağlanması ve sinyalinde görev alan diğer proteinlerle etkileşime girerek yapar. *APC* geninde mutasyon taşıyan insanların çoğunda kolorektal kanser meydana gelmesine rağmen, poliplerin sayısı ve tümörün meydana geldiği zaman mutasyonun gendeki yerine bağlıdır.

Yapılan bir çalışmada göğüs kanseri hastalarında %52,5 oranında *APC* metilasyonu gözlenmiştir (Cho et al., 2010). Metastazik kolon kanserlerinde ise *APC* metilasyonunun primer kolon kanserlerine oranla daha fazla olduğu bulunmuştur (Chen et al., 2005).

2.2.2.3. *RASSF1A* (Ras association domain family member 1A) Geni

Bu gen, *RAS* efektör proteinlerine benzer bir proteini kodlamaktadır ve 3. kromozomun p21 bölgesinde yer almaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.6. İnsan 3. kromozomu üzerinde *RASSF1A* geninin yerleşiminin gösterilmesi (www.ensembl.org).

Tümör baskılayıcı olan bu gendeki herhangi bir kayıp ya da ifadedeki değişim, birçok kanser türünün oluşmasına neden olur. Genin baskılanmasının, promotor bölgesindeki CpG adasının hipermetilasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur. İfade olan protein, DNA tamir proteini olan XPA ile etkileşime girmektedir. Bu protein aynı zamanda siklin D1'in birikmesini inhibe eder ve böylece hücre döngüsünün durdurulmasını sağlar. Alternatif sıplays sonucu oluşan 7 transkript varyantından biridir.

Kolorektal kanserli hastaların tümör dokuları alınarak yapılan bir çalışmada 48 hasta bireyin 39'unda (%81,3) *RASSF1A* geninin promotor bölgesinde metilasyon gözlenmiştir (Sakamoto et al., 2004). Göğüs kanseri hastalarında ise *RASSF1A* metilasyonunun %82,5 oranında olduğu bulunmuş ve bu oranın oldukça yüksek bir değer olduğu belirtilmiştir (Cho et al., 2010).

2.3. Kanser Teşhisinde Promotor Hipermetilasyonunun Tümör Belirteci Olarak Kullanımı

Kanserin tanımlanması, karakterizasyonu ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan genetik ve moleküler biyobelirteçler, tümör belirteçleri olarak adlandırılmaktadır (Bigbee and Herberman, 2003).

Birçok kanser türünde erken teşhis başarılı bir tedavi için kritik rol oynamaktadır. Teşhiste kullanılan geleneksel metotlar (sitoloji, histopatoloji, immünohistokimya,

seroloji vb.) kullanışlıdır ama son zamanlarda geliştirilen ve kullanılan moleküler belirteçler, tümörleri daha çok alt sınıfa ayırabilirler (Das and Singal, 2004).

İdeal bir tümör belirtecinin özellikleri arasında özgül olması, yanlış negatiflik oranının düşük ve özgünlüğünün yüksek olması, küçük boyutlu tümörlerde dahi pozitif sonuç vermesi, ölçülen düzeyi tümör büyüklüğü ile paralellik göstermesi ve maliyetinin düşük olması sayılabilir (Widschwendter and Menon, 2006).

Geçtiğimiz on yıl boyunca moleküler belirteçler, erken teşhis ve hasta takibi için ümit vaat eden araçlar olmuşlardır. DNA temelli yaklaşımlar arasında DNA metilasyonu, diğer moleküler belirteçlerden daha avantajlıdır. İnsan kanserlerindeki anahtar genlerin promotor hipermetilasyonu sıklıkla gerçekleşen bir olaydır ve transkripsiyonel sessizleşmeyle alakalıdır. Ayrıca, birçok insan tümöründe bazı metilasyon belirteçleri beraber araştırıldığında, bir ya da daha fazla hipermetile lokus bulunmuştur. Kanserle bağlantılı metillenmiş genlerin listesi her geçen gün artmakta ve her bir tümör tipi için özgül hipermetilasyon motifi belirlenmektedir (Esteller, 2005).

Metilasyon profili tümör tiplerini ve alt tiplerini ayırabilir ve belki de kemoterapötik ajanlara karşı cevapta ve hayatta kalma durumundaki farklılıkları ortaya koyabilir. Promotor hipermetilasyonu tümör oluşumunun erken safhalarında meydana gelmektedir. Bu nedenle, malignant değişimlerden önce meydana gelen metilasyon değişiklikleri genellikle kanserin erken teşhisinde kullanılabilir. Hatta birçok durumda plazmadan kanser hücreleri hassas bir şekilde elde edilebilir. Bu kanser tiplerine örnek olarak mesane kanseri, göğüs kanseri, kolorektal kanser, özefagus kanseri, mide kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri, baş ve omuz tümörleri ve karaciğer kanseri verilebilir. Ayrıca eksfoliyatif sitoloji, endoskopik fırça teknikleri ve idrar, tükürük gibi biyopsi örnekleri kullanılabilir. Bunlar çok az invaziv olan ya da hiç invaziv olmayan metotlardır ve genellikle hem toplanması hem de işlenmesi daha kolaydır (Widschwendter and Menon, 2006).

Metilasyonun belirlenmesi için son yıllarda kullanılan teknikler sodyum bisüfit dönüşümü, cDNA mikroarray, restriksiyon landmark genomik tarama ve CpG adası microarrayleri gibi çok güçlü teknikleri içermektedir. Sodyum bisüfit metodu normal ve anormal metilasyon motiflerini haritalamada idealdir. Sodyum bisüfit,

metillenmemiş sitozinleri urasile dönüştürürken metillenmiş sitozinleri değiştirmeden bırakır. Bisülfite modifikasyonundan sonra CpG adası metilasyonunu çalışmak için birçok metot bulunmaktadır. Bunlar; dizi analizi, metilasyona özgü polimeraz zincir reaksiyonu (MSP), birleşik bisülfite restriksiyon analizleri, metilasyona duyarlı tek nükleotit primer uzaması ve metilasyona duyarlı tek zincir konformasyonel polimorfizmleridir (Das and Singal, 2004).

DNA metilasyon belirteçlerinin kanser teşhisindeki hassasiyeti, kanserin ve genin tipine, kullanılan vücut sıvısına ve uygulanan tekniklere bağlıdır. Yöntem klinik olarak kullanılmadan önce standart bir hale getirilmeli ve koruyucu yapısının kullanışlı olduğu gösterilmelidir. Rutin olarak teşhiste kullanışlı olması için metilasyonu belirleme metodunun hassas, hızlı, kolay ve tekrarlanabilir olması gerekir. Kullanılan birçok yöntem arasında metilasyona özgü polimeraz zincir reaksiyonu en kullanışlı metot olarak görülmektedir (Das and Singal, 2004).

2.3.1. DNA Metilasyonunun Belirlenmesinde Kullanılan Bisülfite Dönüşümü

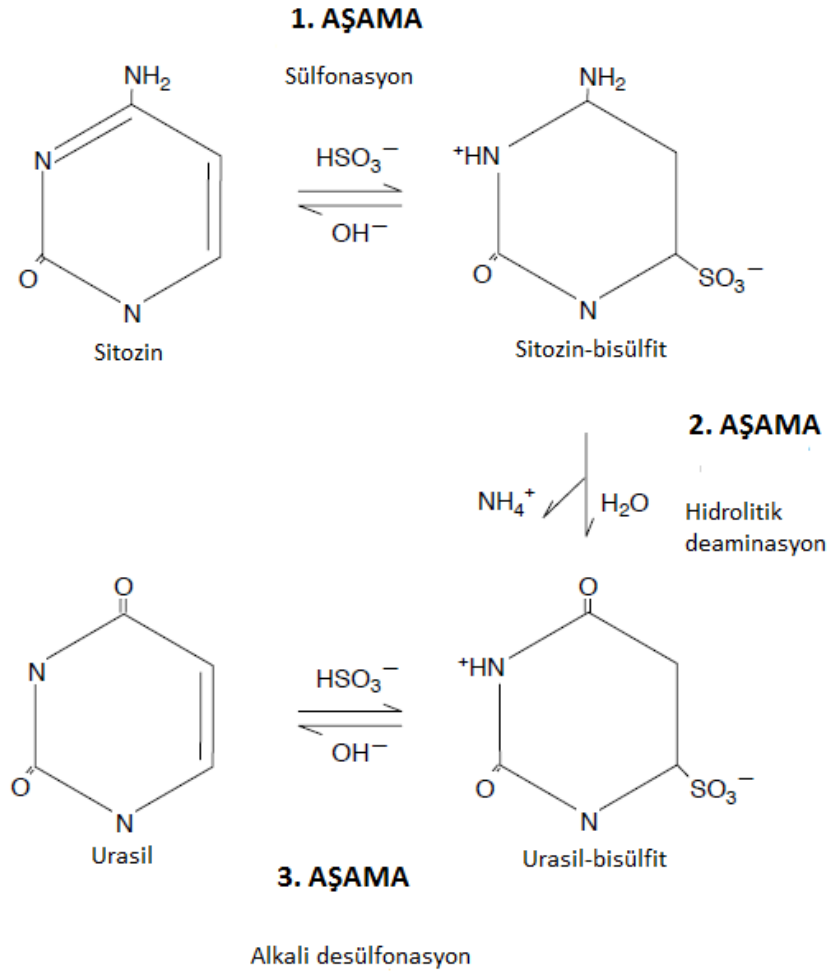
Bisülfite dönüşümünü kullanarak 5-metil sitozinin belirlenmesi ilk kez Frommer ve arkadaşları tarafından belirtilmiştir, Clark ve arkadaşları tarafından da uygulanmıştır (Esteller, 2005).

Metilli sitozinleri belirleme yöntemi, sitozinleri ve metillenmiş sitozinleri birbirinden ayıran, sodyum bisülfite gerçekleştirilen kimyasal bir reaksiyonunu temel alır. Bu reaksiyonun mekanizması ilk kez 1970'li yıllarda belirtilmiştir (Esteller, 2005).

Bisülfite reaksiyonunun meydana gelmesi için ortamdaki DNA'nın mutlaka tek zincirli olması gerekir bu yüzden bisülfite reaksiyonu öncesi genomik DNA tamamen denatüre edilir. Reaksiyon 3 aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.6):

1. Sülfonasyon: Sitozinin 5. ve 6. karbon atomları arasındaki çift bağa bisülfite eklenir.
2. Hidrolitik deaminasyon: Sitozin-bisülfite ara ürünü, urasil-bisülfite ara ürününü vermek üzere deaminasyona uğrar.

3. Alkali desülfonasyon: Alkali muamele sonucu sülfonat grubu ayrılır ve urasil oluşur.



Şekil 2.7. Bisülfite dönüşümünün şeması (Esteller, 2005).

Sülfonasyon oluşumunun miktarı, pH, bisülfite konsantrasyonu ve sıcaklık ile kontrol edilir. İleriye giden sülfonasyon reaksiyonu düşük pH şartlarında olurken tersine gerçekleşen reaksiyon yüksek pH koşulları gerektirir. Reaksiyonun ikinci aşamasında, sitozin-SO₃ hidrolitik deaminasyon ile urasil-SO₃'e dönüşür. Bu aşama sülfite, bisülfite ve asetat anyonları gibi temel maddelerle katalizlenir. Sülfonasyon, asidik pH'da gerçekleştiği için çift yönlü olan sülfonasyon reaksiyonu ile bunun devamı olan geri dönüşümsüz deaminasyon aşaması, pH 5'de ve yüksek bisülfite konsantrasyonunda meydana gelir. Bisülfite oksijenle kendiliğinden

oksitlenir bu nedenle, oksidatif degradasyonu en aza indirmek için reaksiyona serbest radikal eklenmektedir. Üçüncü aşama alkali ortamda gerçekleşerek pH değişimi yaratır ve bisülfid ara ürünü uzaklaştırılır (Esteller, 2005).

Başarılı bir bisülfid dönüşümü gerçekleştirmek için; temiz ve tamamen denatüre olmuş DNA, taze hazırlanmış sodyum bisülfid çözeltisi, deaminasyon reaksiyonu için düşük pH, desülfonasyon reaksiyonu için yüksek pH ve bisülfid oksidasyonunu azaltmak için ortamda hidrokinon olması gerekmektedir. İnkübasyon süresi, kullanılan DNA miktarına ve kaynağına göre değişir. Genel bir kural olarak, dönüşümün tamamen gerçekleşmesi için, vücut sıvılarındaki gibi az miktardaki DNA'nın inkübasyon süresi kısayken (4-8 saat), hücre hatları veya dokulardan elde edilen DNA için bu süre 16 saate kadar çıkar (Esteller, 2005).

Bisülfid dönüşümünden sonra metillenmemiş olan sitozinler urasil rezidularına dönecek, metillenmiş sitozinler ise aynı kalacaktır. Bisülfid tarafından sitozinin urasile dönüşümü oldukça seçicidir ve "standart" şartlarda verimli bir şekilde meydana gelir. Kimyasal dönüşüm oranı %99,5 ile 99,7 arasındadır ama bazen DNA'nın kalitesine göre %95 ile 98 arasında olabilir (Esteller, 2005).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hasta ve Kontrol Örneklerinin Toplanması

Tez kapsamında incelenen hasta grubu, endoskopik/kolonoskopik değerlendirmede tümör varlığı tespit edilen 20 birey, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Gastroenteroloji Polikliniği'nden seçilmiştir. Hasta grubundan 9 birey mide kanseri klinik tanılı, 10 birey kolorektal kanser klinik tanılı ve 1 birey de özefagus kanseri klinik tanılıdır. Hasta grubuna ait bireylerin yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu ve evresine ait bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir. Kontrol grubu ise, gönüllülük esasına dayanarak 15 sağlıklı bireyden oluşmuştur ve bu bireylerde tümör varlığına dair bir kanıt bulunmamaktadır.

Çizelge 3.1. Hasta grubuna ait bireylerdeki tümör lokalizasyonları ve evreleri, bireylerin yaşları ve cinsiyetleri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Tümör Lokalizasyonu	Evre
1	72	E	mide	4
3	76	E	mide	3
4	60	E	mide	3
5	63	E	mide	2
7	61	E	mide	3
8	74	E	mide	4
13	67	E	mide	3
15	81	E	mide	3
17	55	K	mide	4
2	71	E	kolorektal	4
6	55	E	kolorektal	3
9	78	E	kolorektal	4
10	67	E	kolorektal	3
11	60	E	kolorektal	2
12	56	K	kolorektal	4
16	56	E	kolorektal	4
18	74	E	kolorektal	4
19	74	E	kolorektal	3
20	-	E	kolorektal	-
14	71	E	özefagus	3

Etik kurallar çerçevesinde, hasta grubuna dahil edilen bireylerin her birinden endoskopi/kolonoskopi ile doku örneği alınmış ve örnekler +4°C'de buzdolabında

saklanmıştır. Kontrol grubuna dahil edilen bireylerin her birinden de yaklaşık 10 ml kan örneği EDTA'lı tüplerde toplanmıştır.

3.2. Kandan ve Dokudan DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için Yen ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan DNA izolasyonu yöntemi bazı değişiklikler uygulanarak kullanıldı (Yen et al., 1992). Bireylerden EDTA'lı tüplere alınan yaklaşık 3-4 ml kan örneklerine ve cerrahi yöntemlerle alınan doku örneklerine aşağıda belirtilen basamakları içeren DNA izolasyon yöntemi uygulandı.

1. 1.5 ml'lik ependorf tüp içersine konulan doku örneği üzerine 300 µl Tris-EDTA (TE) tamponu ilave edildi ve ezici bir çubukla doku mekanik olarak parçalandı. Doku örnekleri için bu aşamadan sonra 7. basamağa geçildi.
2. EDTA'lı tüplere alınan kanın 400 µl'si 1.5 ml'lik ependorf tüp içine aktarıldı.
3. Ependorf tüp içindeki 300 µl kan örneğine TE tamponu ilave edilerek hacim 1.5 ml'ye tamamlandı.

TE Tamponu: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=7.6

4. Tüpler 13000 rpm'de 2 dakika santrifüje edildi.
5. Santrifügasyon sonunda üstteki süpernatant alttaki pelete dokunulmadan atıldı.
6. Yıkama işlemi (2., 3. ve 4. basamaklar) iki kez tekrarlanarak gerçekleştirildi.
7. Süpernatant atıldıktan sonra pelet üzerine 180 µl lizis tamponu ilave edildi. Üzerine TE tamponu ilave edilerek son hacim 500 µl'ye tamamlandı.

Lizis Tamponu:

%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS) 80µl

1 M NaCl 90µl

10 mg/ml Proteinaz K 10µl

8. Tüpler 56 °C'de 1.5-2 saat inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonunda tüplerin üzerine 1:1 oranında 250'şer µl fenol-kloroform ilave edildi.
10. Tüpler 2500 rpm'de 4 dakika santrifüje edildi.
11. Üst faz alınarak temiz bir ependorfa aktarıldı.
12. Üzerine DNA'nın çökmesi için soğuk %100'lük etil alkol ilave edildi.
13. %100'lük etil alkol uzaklaştırıldıktan sonra %70'lik etil alkol ilave edildi.
14. Tüplerdeki %70'lik etil alkol DNA'ya dokunulmadan uzaklaştırıldı.
15. DNA yaklaşık olarak 200 µl steril distile suda çözüldü.

Spektrofotometrenin dalga boyu 260 nm'ye ayarlanıp izole edilen DNA'ların absorbanları ölçüldü ve miktarları belirlendi.

3.3. Bisülfite Dönüşümü

Tez çalışmasında bisülfite modifikasyonu, Epigentek BisulFlash DNA Modification Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kit yönteminin önerdiği şekilde başlangıçta kullanılan DNA miktarı 1 µg olacak şekilde ayarlanmış ve bisülfite modifikasyonu yaklaşık 25 dakikada gerçekleştirilmiştir.

Modifikasyon sonrası kit içeriğinde bulunan solüsyon ve önceden hazırlanan %90'lık etanol kullanılarak sülfonasyon ve yıkama işlemleri tamamlanmıştır.

Dönüşümü gerçekleştirilmiş olan DNA en son olarak 20 µl elüsyon tamponu içinde, -20 °C'de en fazla 4 hafta boyunca saklanmıştır.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR yöntemi, Cetus firmasının insan genetiği bölümünde çalışan Kary Mullis tarafından 1985 yılında geliştirilmiş ve aynı yıl Saiki, Mullis ve arkadaşları tarafından orak hücre anemisinin teşhisinde kullanılmıştır (Saiki et al., 1985). Başarılı bir yöntem olan PZR, daha sonra rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Kary Mullis, bilim dünyasına kazandırdığı bu yöntem sayesinde 1993 yılında Nobel ödülüne layık görülmüştür.

PZR, reaksiyon karışımına eklenen sıcaklığa dayanıklı bir DNA polimeraz katalizörlüğünde gerçekleştirilen ardışık zincir uzamaları ile özgül DNA bölgelerinin in vitro olarak çoğaltıldığı bir tekniktir. Günümüzde PZR yöntemi, mutasyonların tanımlanması, adli tıbbı ilişkin DNA parmak izi analizleri, alelik dizi değişimlerinin tanımlanması, gen ifadesinin belirlenmesi ve kantitasyonu, bakteriyel ve viral enfeksiyonların taranması, prenatal tanı, filogenetik çalışmalar, ancient DNA (aDNA) analizleri ve gen dizi analiz çalışmalarında çok kullanılan bir yöntem haline gelmiştir.

PZR tekniğinde sıcaklığa dayanıklı bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan izole edilen Taq DNA polimeraz enzimi kullanılır. Taq DNA polimeraz enzimi 85 kDa molekül ağırlığında olup, 72 °C'de optimum polimerizasyon aktivitesini gösterir. Polimeraz enzimleri aktivite için serbest magnezyum iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Başarılı bir amplifikasyon için optimum magnezyum derişiminin bilinmesi gerekir. Her dNTP'den 0,2 mM kullanıldığında optimum magnezyum derişimi 1,5-4 mM arasındadır.

PZR tekniğı, birbirini takip eden üç basamaktan oluşur:

1. Denatürasyon Basamağı: Yüksek sıcaklıkta (90-95 °C) DNA çift zincirinin ayrılması sağlanır.
2. Birleşme Basamağı: Primerlerin uygun bir sıcaklıkta (50-70°C) tek zincirli hale getirilmiş DNA kalıbına bağlanması sağlanır. Primerler 18-22 nükleotit uzunluğunda yapay oligonükleotitlerdir ve çoğaltılacak DNA bölgesinin uçlarındaki tanımlayıcı dizilere özgül olarak bağlanır.

3. Zincir Uzama Basamağı: Optimum çalışma sıcaklığında polimeraz enzimi (70-75 °C), ortamdaki serbest nükleotitleri, kalıp DNA'ya komplementer olacak şekilde primerin 3' ucuna doğru ekleyerek zincirin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur.

Bu üç basamağın ardarda (20-30 kez) tekrarlanması sonucunda ilgili DNA bölgesinin çok sayıda kopyası meydana getirilmiş olur.

3.4.1. Metilasyona Özgü Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MSP)

Metilasyon analizi, bisülfite dönüşümü yapılmış DNA'nın özgül primerlerle amplifikasyonu sayesinde olur. Bisülfite dönüşümü yapılmayan bir DNA kalıbındaki metilasyon profili MSP yöntemi ile analiz edilemez; çünkü metillenmiş ve metillenmemiş sitozin rezidularının birbirinden ayırt edilebilir olması yöntemin esas koşuludur. Bu nedenle, öncelikle bisülfite reaksiyonu uygulanır ve daha sonrasında PZR analizleri gerçekleştirilir (Esteller, 2005).

Seçilen primer tipleri gözlenen metilasyon sonuçlarını etkileyecektir. Metillenmiş bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri (M) ile metillenmemiş bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri (U) birbirinden farklıdır. Bu primer setleri kullanılarak metilasyonun olup-olmadığı ya da bisülfite dönüşümünün gerçekleşip-gerçekleşmediği anlaşılır. DNA'nın aynı oranlarda çoğaltılması için PZR şartlarının optimizasyonu oldukça önemlidir (Esteller, 2005).

Tez çalışmasında, bisülfite dönüşümü yapılmış olan örneklerinin *APC*, *p16* ve *RASSF1A* genlerinin promotor bölgelerindeki CpG adalarının metillenmiş veya metillenmemiş olduğunu anlamak amacıyla PZR yöntemiyle amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir.

Araştırılan üç genin promotor bölgesindeki metilasyonun gözlemlenebilmesi için her bir gen bölgesine ait metillenmiş ve metillenmemiş bölgeleri ayırt edebilecek primer çiftleri sentezletilmiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3). Böylece bisülfite dönüşümü sonunda yapılan PZR reaksiyonu, urasile dönüşen sitozinleri ve metilsitozin halinde kalan sitozin bazlarını birbirinden ayırt ederek amplifikasyonu gerçekleştirmiştir (Çizelge 3.2).

GGGCTAGGGCTAGGCAGGCTGTGCGGTTGGGCGGGGCCCTGTGCCCCACTGCGGAGTGCG
GGTCGGGAAGCGGAGAGAGAAGCAGCTGTGTAATCCGCTGGATGCGGACCAGGGCGCTCC
CCATTC CCGTCGGGAGCCCGCCGA TTGGCTGGGTGTGGGCGCACGTGACCGACATGTGGC
TGTATTGGTGCAGCCCCGCCAGGGTGTC ACTGGAGACAGAATGGAGGTGCTGCCGGACTCG
GAAATGGG TAGGTGCTGGAGCCACCATGGCCAGGCTTGCTGCGGGGGGAGGGGGGAAGG
TGGTTTTCCCTCGCACTGTCTTAAACCGATGGCCTTTCCTTGGCACAGGGTCCACTGCAG
CATGCCAAACGAGGAGGCAGGGGCGTCGTCCCCCGCCCCCACTGCAGCACTGGAGATG

2. ekzon

Şekil 3.1. APC gen dizisi üzerinde primerlerin gösterilmesi (Primerler sarı renkle gösterilmiştir. U ve M primer çiftleri metilasyon profiline göre değiştirilmiştir.)

GGCTCTGGCGAGGGCTGCTTCCGGCTGGTGCCCCGGGGGAGACCCAACCTGGGGCGACT
TCAGGGGTGCCACATTCGCTAAGTGCTCGGAGTTAATAGCACCTCCTCCGAGCACTCGCT
CACGGCGTCCCCCTTGCTTGAAAGATACCGCGGTCCCTCCAGAGGATTTGAGGGACAGGG
TCGGAGGGGGCTCTTCCGCCAGCACCGGAGGAAGAAAGAGGAGGGGCTGGCTGGTCACCA
GAGGGTGGGGCGGACCGC GTGCGCTCGGCGGCTGCGGAGAGGGGGAGAGCAGGCAGCGGG
CGGCGGGGAGCAGCATGGAGCCGGCGGCGGGGAGCAGCATGGAGCCTTCGGCTGACTGGC
TGGCCACGGCCGCGGCCCGGGGTCGGGTAGAGGAGGTGCGGGCGCTGCTGGAGGCGGGGG
CGCTGCCCCAACGCACCGAATAGTTACGGTTCGGAGGCCGATCCAGGTGGGTAGAGGGTCTG
CAGCGGGAGCAGGGGATGGCGGGCGACTCTGGAGGACGAAGTTTGCAGGGGAATTGGAAT
CAGGTAGCGCTTCGATTCTCCGGAAAAAGGGGAGGCTTCTGGGGAGTTTTCAGAAGGGG
TTTGTAAATCACAGACCTCCTCCTGGCGACGCCCTGGGGGCTTGGGAAGCCAAGGAAGAGG
AATGAGGAGCCACGCGGTACAGATCTCTCGAATGCTGAGAAGATCTGAAGGGGGGAACA
TATTTGTATTAGATGGAA GTATGCTCTTTATCAGATACAAAATTTACGAACGTTTGGGAT

5. ekzon

Şekil 3.2. p16 gen dizisi üzerinde primerlerin gösterilmesi (Primerler sarı renkle gösterilmiştir. U ve M primer çiftleri metilasyon profiline göre değiştirilmiştir.)

ACGAAGGAGGGAAGGAAGGGCAAGGCGGGGGGGGCTCTGCGAGAGCGCGCCAGCCCCGC
CTTCGGGGCCCCACAGTCCCTGCACCCAGGTTTCCATTGCGCGGCCTCTCCTCAGCTCCTTC
CCGCCGCCAGTCTGGATCCTGGGGGAGGCGCTGAAGTCGGGGCCCGCCCTGTGGCCCCG
CCCGGCCCGCGCTTGCTAGCGCCCAAAGCCAGCGAAGCACGGGCCCAACCGGGCCATGTC
GGGGGAGCCTGAGCTCATTGAGCTGCGGGAGCTGGCACCCGCTGGGCGCGCTGGGAAGGG
CCGCA CCGGCTGGAGCGTGCCAACGCG CTGCGCATCGCGCGGGGCACCGCTGCAACCC
CACACGGCAGCTGGTCCCTGGCCGTGGCCA CCGCTTCCAGCCCCGGGGCCCCC CCACGCA
CACGTGGTGCACCTCTGTGGCGACTTCATCTGGGGCGTCGTGCGCAAAGGCCTGCAGTG
CGCGC GTGAGTAGTGGCCCCGCGCCTACGAGAGCGGAAGGGGCAGCCAAGGGGCAGCG

1. ekzon

Şekil 3.3. RASSF1A gen dizisi üzerinde primerlerin gösterilmesi (Primerler sarı renkle gösterilmiştir. U ve M primer çiftleri metilasyon profiline göre değiştirilmiştir.)

Çizelge 3.2. Primer çiftlerinin dizileri, koşulları ve meydana getirdikleri amplifikasyon ürününün büyüklüğü

Primer	5'-3' dizisi	PZR Koşulu	Ürün büyüklüğü
<i>p16-U-F</i>	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	94 °C 25sn/64 °C 25sn/72 °C 25sn/30 döngü	151 bç
<i>p16-U-R</i>	CAACCCCAAACCACAACCATAA		
<i>p16-M-F</i>	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	94 °C 25sn/60 °C 25sn/72 °C 25sn/30 döngü	150 bç
<i>p16-M-R</i>	GACCCCGAACCGCGACCGTAA		
<i>APC-U-F</i>	GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT	94 °C 25sn/62 °C 25sn/72 °C 25sn/30 döngü	108 bç
<i>APC-U-R</i>	CCAATCAACAAACTCCCAACAA		
<i>APC-M-F</i>	TATTGCGGAGTGCGGGTC	94 °C 25sn/58 °C 25sn/72 °C 25sn/30 döngü	104 bç
<i>APC-M-R</i>	TCGACGAACTCCCGACGA		
<i>RASSF1A-U-F</i>	TTTGTTGGAGTGTGTTAATGTG	94 °C 25sn/62 °C 25sn/72 °C 25sn/30 döngü	108 bç
<i>RASSF1A-U-R</i>	CAAACCCACAAACTAAAAACAA		
<i>RASSF1A-M-F</i>	GTGTTAACGCGTTGCGTATC	94 °C 25sn/58 °C 25sn/72 °C 25sn/30 döngü	96 bç
<i>RASSF1A-M-R</i>	AACCCCGCGAACTAAAAACGA		

PZR reaksiyon karışımı:

Dönüştürülmüş DNA	2 µl
10X Tampon (25 mM MgCl ₂ içerir)	2,5 µl
2,5 mM dNTP karışımı	1 µl
İleri primer (Forward) (10 pmol/µl)	1 µl
Geri primer (Reverse) (10 pmol/µl)	1 µl
dH ₂ O	17,35 µl
Taq DNA polimeraz (5u/µl)	0,15 µl
Toplam Hacim	25 µl

3.5. PZR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü

10 µl PZR ürünü, 2 µl 6X yükleme çözeltisi (%40 sukroz, %0,25 brom fenol mavisi, %60 10X TBE tamponu) ile karıştırılıp, 0,5 µg/ml olacak şekilde Etidyum bromür içeren %3'lük agaroz jele yüklenmiştir ve yaklaşık 45 dakika boyunca 110 V'luk sabit voltaj uygulanmıştır. Jeller, 300 nm dalga boyuna ayarlı UV transluminatörde özel kalkan altında incelenmiştir.

3.6. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler SPSS 15.0 for Windows Evaluation Version paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MSP sonucu elde edilen veriler kullanılarak hasta ve kontrol gruplarını kapsayan karşılaştırmalar χ^2 testi ile analiz edilmiştir.

Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR

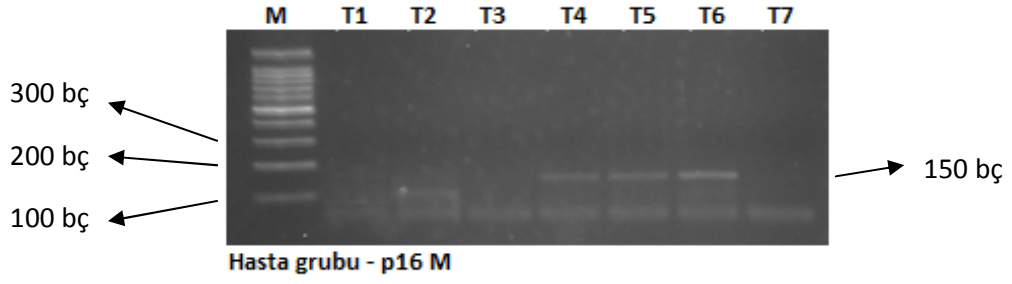
Tez çalışmasında, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Gastroenteroloji Polikliniği'ne başvuran ve endoskopik/kolonoskopik incelemeleri sonucunda tümör varlığı saptanan 20 bireye ait doku örneklerinden ve kontrol grubu olarak incelenen 15 sağlıklı bireye ait periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'ların, Epigentek BisulFlash DNA Modification Kit kullanılarak bisülfite dönüştürmeleri yapılmıştır. Bu örneklerde *p16*, *APC* ve *RASSF1A* genlerinin promotor metilasyonları MSP tekniği ile araştırılmıştır.

4.1. Hasta ve kontrol bireylerinde *p16*, *APC* ve *RASSF1A* genlerinin promotor bölgesi metilasyonlarının gösterilmesi

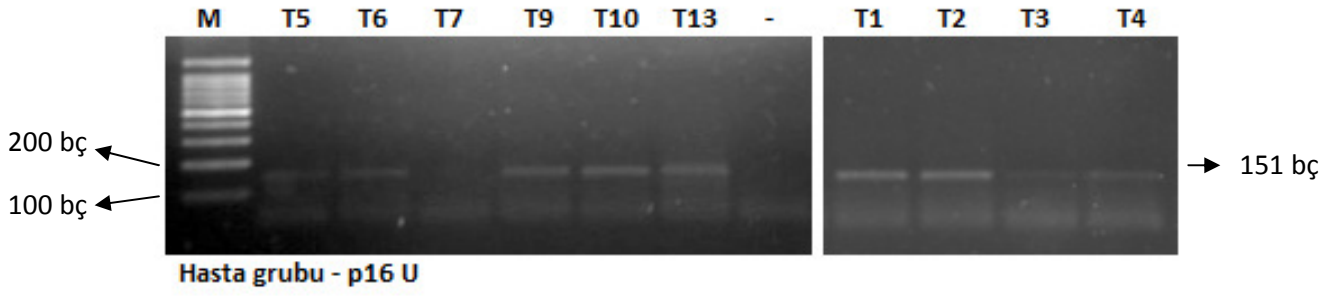
Tez çalışmasında, gastrointestinal sistem kanserlerinin meydana gelmesinde görev alan tümör baskılayıcı *p16*, *APC* ve *RASSF1A* genlerinin promotor metilasyonları, MSP analizlerine uygun olacak şekilde tasarlanan metillenmiş ve metillenmemiş diziye özgü primer dizileri ile hasta ve kontrol gruplarında belirlenmiştir.

4.1.1. Hasta ve kontrol bireylerinde *p16* geninin promotor bölgesi metilasyonunun gösterilmesi

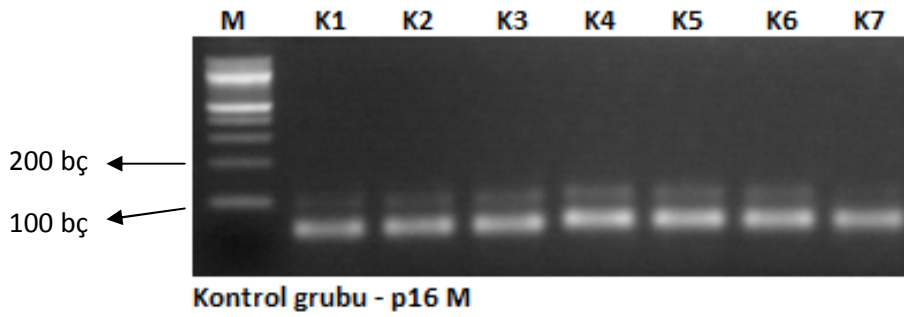
p16 geninin promotor metilasyonunun belirlenmesi için yapılan MSP analizinde metillenmiş ve metillenmemiş primer çiftleri kullanılarak hasta ve kontrol gruplarına ait bireylerin 150 bp (metillenmiş bölgeyi çoğaltan primer ile) ve 151 bp (metillenmemiş bölgeyi çoğaltan primer ile) uzunluğundaki PZR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4).



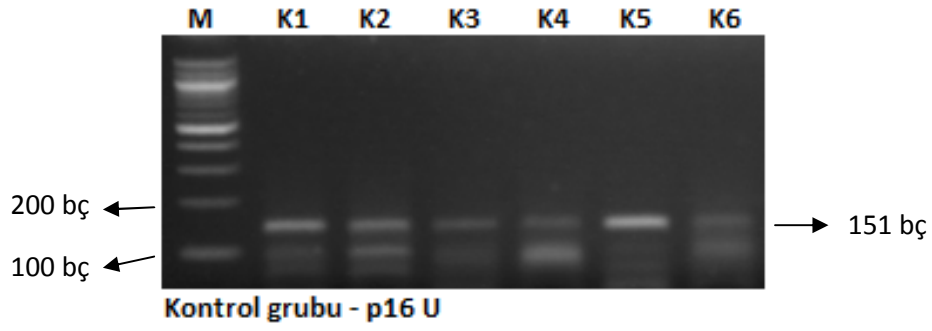
Şekil 4.1. Hasta grubuna ait *p16* M amplifikasyon sonuçları. T (Tümör doku). M (100 bç markır)



Şekil 4.2. Hasta grubuna ait *p16* U amplifikasyon sonuçları. T (Tümör doku). M (100 bç markır).



Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait *p16* M amplifikasyon sonuçları. K (Kontrol). M (100 bç markır).



Şekil 4.4. Kontrol grubuna ait *p16* U amplifikasyon sonuçları. K (Kontrol). M (100 bç markır).

p16 geninin promotoru, hasta grubuna ait bireylerin 6/20'sinde (%30) metillenmiş, 18/20'sinde (%90) metillenmemiş halde bulunmuştur. Kontrol grubuna ait bireylerin ise 13/15'inde (%86,7) *p16* geni promotor bölgesinin metillenmemiş halde olduğu bulunmuştur.

Mide kanseri örneklerinin 3/9'unda (%33,3) metillenmiş, 8/9'unda (%88,9) metillenmemiş; kolorektal kanser örneklerinin 3/10'unda (%30,3) metillenmiş, 9/10'unda (%90,0) metillenmemiş *p16* promotor bölgesi belirlenmiştir. Özefagus kanseri olan bir kişide ise *p16* promotor bölgesinin metillenmemiş olduğu bulunmuştur.

Hasta ve kontrol gruplarına ait bireyler arasındaki *p16* promotor bölgesi metilasyon farklılığı anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.1). Tümörün lokalizasyonu ile *p16* promotor bölgesi metilasyonu arasındaki fark anlamlı değildir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol grupları arasındaki *p16* metilasyonu farkının ki-kare testi ile karşılaştırılması ve *p* değeri

	<i>p16</i> M	<i>p16</i> U	<i>p16</i> M ve <i>p16</i> U	Toplam	<i>p</i>
Hasta	0	12	6	18	
Kontrol	0	15	0	15	0,013
Toplam	0	27	6	33	

Çizelge 4.2. Tümörün lokalizasyonu ile *p16* metilasyonu arasındaki farkın ki-kare testi ile karşılaştırılması ve *p* değeri

	<i>p16</i> M		Toplam	<i>p</i>
	+	-		
Mide	3 (%33,3)	6 (%66,7)	9 (%100,0)	0,876
Kolorektal	3 (%30,0)	7 (%70,0)	10 (%100,0)	
Toplam(Tümör tiplerinde)	6 (%31,6)	13 (%68,4)	19 (%100,0)	

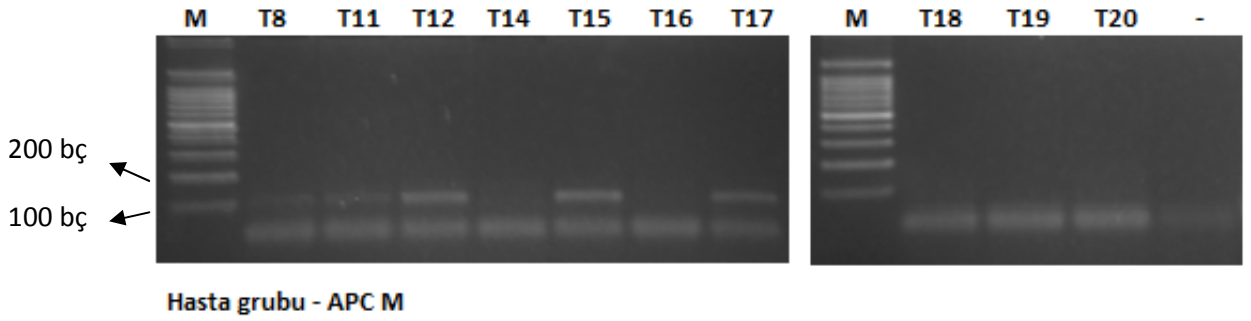
Hasta bireyler arasında tümörün evresi ile *p16* metilasyonu arasındaki farkın anlamlı olmadığı, fakat yaş ile *p16* metilasyonu arasındaki farkın anlamlı olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.3). Yaşı 60'tan küçük olan hasta bireylerde *p16* metilasyonu artarken, 60'tan büyük olanlarda ise metillenmemiş *p16* promotor bölgesi daha çok görülmüştür.

Çizelge 4.3. Hastaların bazı klinik ve patolojik özellikleri ile *p16* geninin promotor bölgesinin metillenme/metillenmeme durumu arasındaki farkın ki-kare testi ile karşılaştırılması ve *p* değerleri

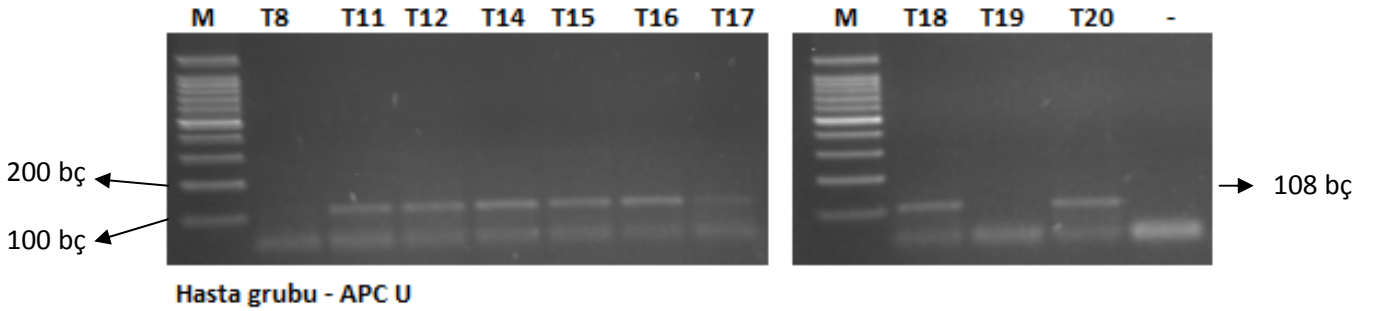
	<i>p16</i> M		Toplam	<i>p</i>	<i>p16</i> U		Toplam	<i>p</i>
	+	-			+	-		
Hasta (n=20)	6 (%30,0)	14 (%70,0)	20 (%100,0)		18 (%90,0)	2 (%10,0)	20 (%100,0)	
Kontrol (n=15)	0 (%0,0)	15 (%100,0)	15 (%100,0)	0,02	13 (%86,7)	2 (%13,3)	15 (%100,0)	0,759
Tümör Lokalizasyonu								
mide (n=9)	3 (%33,3)	6 (%66,7)	9 (%100,0)		8 (%88,9)	1 (%11,1)	9 (%100,0)	
kolorektal (n=10)	3 (%30,3)	7 (%70,0)	10 (%100,0)		9 (%90,0)	1 (%10,0)	10 (%100,0)	
özefagus (n=1)	0 (%0,0)	1 (%100,0)	1 (%100,0)	0,788	1 (%100,0)	0 (%0,0)	1 (%100,0)	0,94
Toplam (Tümör tipleri içinde)	6 (%30,0)	14 (%70,0)	20 (%100,0)		18 (%90,0)	2 (%10,0)	20 (%100,0)	
Tümör Evresi								
2 ve 3	4 (%36,4)	7 (%63,6)	11 (%100,0)		9 (%81,8)	2 (%18,2)	11 (%100,0)	
4	2 (%25,0)	6 (%75,0)	8 (%100,0)	0,599	8 (%100,0)	0 (%0,0)	8 (%100,0)	0,202
Toplam (Tümör Evresi içinde)	6 (%31,6)	13 (%68,4)	19 (%100,0)		17 (%89,5)	2 (%10,5)	19 (%100,0)	
Yaş								
>60	2 (%15,4)	11 (%84,6)	13 (%100,0)		11 (%84,6)	2 (%15,4)	13 (%100,0)	
≤60	4 (%66,7)	2 (%33,3)	6 (%100,0)	0,025	6 (%100,0)	0 (%0,0)	6 (%100,0)	0,31
Toplam (Yaş içinde)	6 (%31,6)	13 (%68,4)	19 (%100,0)		17 (%89,5)	2 (%10,5)	19 (%100,0)	

4.1.2. Hasta ve kontrol bireylerinde *APC* geninin promotor bölgesi metilasyonunun gösterilmesi

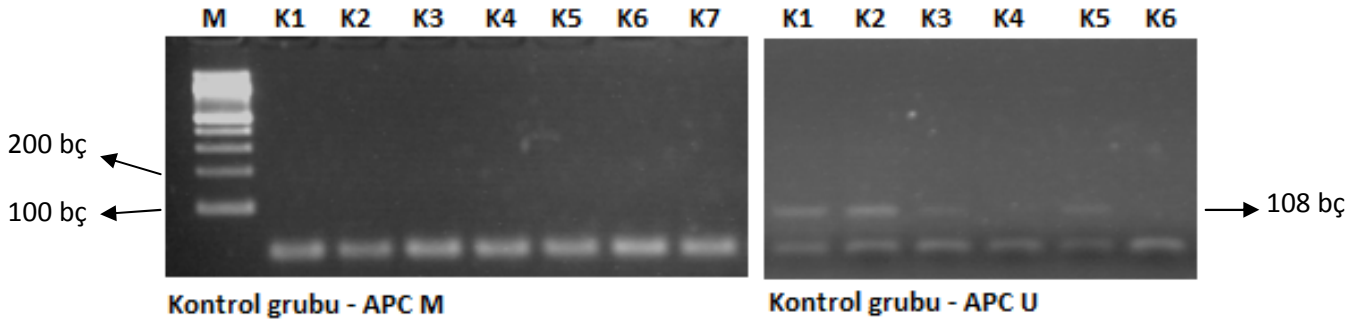
APC geninin promotor bölgesi metilasyonunun belirlenmesi için yapılan MSP analizinde metillenmiş ve metillenmemiş primer çiftleri kullanılarak hasta ve kontrol gruplarına ait bireylerin 104 bç (metillenmiş bölgeyi çoğaltan primer ile) ve 108 bç (metillenmemiş bölgeyi çoğaltan primer ile) uzunluğundaki PZR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7).



Şekil 4.5. Hasta grubuna ait *APC* M amplifikasyon sonuçları. T (Tümör doku). M (100 bç markır).



Şekil 4.6. Hasta grubuna ait *APC* U amplifikasyon sonuçları. T (Tümör doku). M (100 bç markır).



Şekil 4.7. Kontrol grubuna ait *APC* M ve *APC* U amplifikasyon sonuçları. K (Kontrol). M (100 bç markır).

APC geni promotorunun, hasta grubuna ait bireylerin 10/20'sinde (%50,0) metillenmiş, 6/20'sinde (%30,0) metillenmemiş olduğu bulunmuştur. Kontrol grubuna ait bireylerde metillenme görülmezken, 10/15'inde (%66,7) metillenmemiş *APC* promotor bölgesi olduğu bulunmuştur.

Mide kanseri örneklerinin 8/9'unda (%88,9) metillenmiş, 6/9'unda (%66,7) metillenmemiş; kolorektal kanser örneklerinin 2/10'unda (%20,0) metillenmiş, 9/10'unda (%90,0) metillenmemiş *APC* promotor bölgesi belirlenmiştir. Özefagus kanseri olan bir kişide ise *APC* promotor bölgesinin metillenmemiş olduğu bulunmuştur.

Hasta ve kontrol gruplarına ait bireyler arasındaki *APC* promotor bölgesi metilasyonu farklılığı anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.4). Aynı şekilde, tümörün lokalizasyonu ile *APC* geninin promotor metilasyonu arasındaki farklılık da anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4. Hasta ve kontrol grupları arasındaki *APC* metilasyonu farkının ki-kare testi ile karşılaştırılması ve *p* değeri

	<i>APC</i> M	<i>APC</i> U	<i>APC</i> M ve <i>APC</i> U	Toplam	<i>p</i>
Hasta	2	8	9	19	
Kontrol	0	14	1	15	0,008
Toplam	2	22	10	34	

Çizelge 4.5. Tümörün lokalizasyonu ile *APC* metilasyonu arasındaki farkın ki-kare testi ile karşılaştırılması ve *p* değeri

	<i>APC M</i>		Toplam	<i>p</i>
	+	-		
Mide	8 (%88,9)	1 (%11,1)	9 (%100,0)	0,003
Kolorektal	2 (%20,0)	8 (%80,0)	10 (%100,0)	
Toplam(Tümör tiplerinde)	10 (%52,6)	9 (%47,4)	19 (%100,0)	

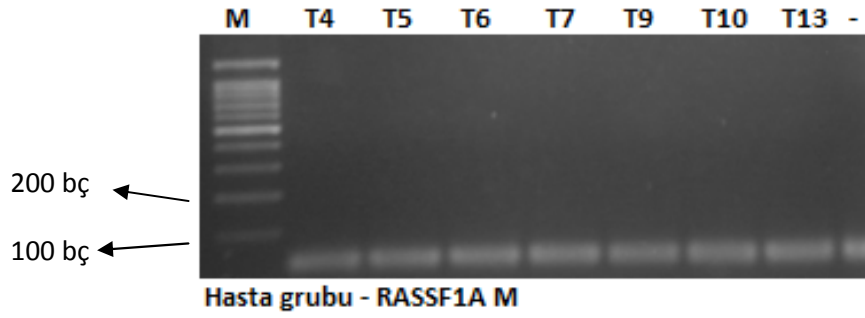
Hasta bireylerde tümörün evresi ve bireylerin yaşı ile *APC* promotor bölgesi metilasyonu açısından anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Hastaların bazı klinik ve patolojik özellikleri ile *APC* geninin promotor bölgesinin metillenme/metillenmeme durumu arasındaki farkın ki-kare testi ile karşılaştırılması ve *p* değerleri

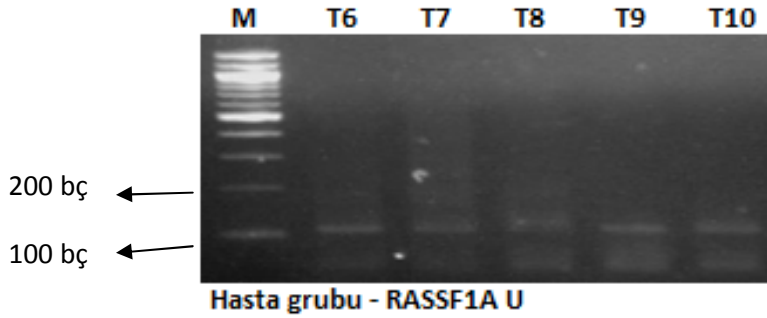
	APC M		Toplam	p	APC U		Toplam	p
	+	-			+	-		
Hasta (n=20)	10 (%50,0)	10 (%50,0)	20 (%100,0)	0,001	16 (%80,0)	4 (%20,0)	20 (%100,0)	0,372
Kontrol (n=15)	0 (%0,0)	15 (%100,0)	15 (%100,0)		10 (%66,7)	5 (%33,3)	15 (%100,0)	
Tümör Lokalizasyonu								
mide (n=9)	8 (%88,9)	1 (%11,1)	9 (%100,0)	0,007	6 (%66,7)	3 (%33,3)	9 (%100,0)	0,392
kolorektal (n=10)	2 (%20,0)	8 (%80,0)	10 (%100,0)		9 (%90,0)	1 (%10,0)	10 (%100,0)	
özefagus (n=1)	0 (%0,0)	1 (%100,0)	1 (%100,0)		1 (%100,0)	0 (%0,0)	1 (%100,0)	
Toplam (Tümör tipleri içinde)	10 (%50,0)	10 (%50,0)	20 (%100,0)		16 (%80,0)	4 (%20,0)	20 (%100,0)	
Tümör Evresi								
2 ve 3	6 (%54,5)	5 (%45,5)	11 (%100,0)	0,845	8 (%72,7)	3 (%27,3)	11 (%100,0)	0,435
4	4 (%50,0)	4 (%50,0)	8 (%100,0)		7 (%87,5)	1 (%12,5)	8 (%100,0)	
Toplam (Tümör Evresi içinde)	10 (%52,6)	9 (%47,4)	19 (%100,0)		15 (%78,9)	4 (%21,1)	19 (%100,0)	
Yaş								
>60	6 (%46,2)	7 (%53,8)	13 (%100,0)	0,405	9 (%69,2)	4 (%30,8)	13 (%100,0)	0,126
≤60	4 (%66,7)	2 (%33,3)	6 (%100,0)		6 (%100,0)	0 (%0,0)	6 (%100,0)	
Toplam (Yaş içinde)	10 (%52,6)	9 (%47,4)	19 (%100,0)		15 (%78,9)	4 (%21,1)	19 (%100,0)	

4.1.3. Hasta ve kontrol bireylerinde *RASSF1A* geninin promotor bölgesi metilasyonunun gösterilmesi

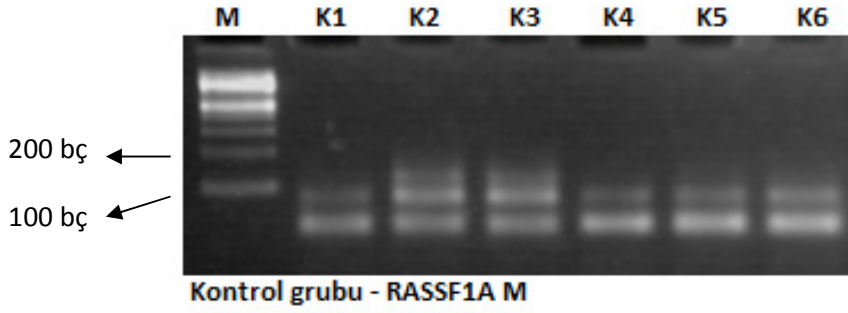
RASSF1A geninin promotor bölgesi metilasyonunun belirlenmesi için yapılan MSP analizinde metillenmiş ve metillenmemiş primer çiftleri kullanılarak hasta ve kontrol gruplarına ait bireylerin 96 bç (metillenmiş bölgeyi çoğaltan primer ile) ve 108 bç (metillenmemiş bölgeyi çoğaltan primer ile) uzunluğundaki PZR ürünleri elde edilmesi amaçlanmıştır (Şekil 4.8, 4.9, 4.10 ve 4.11).



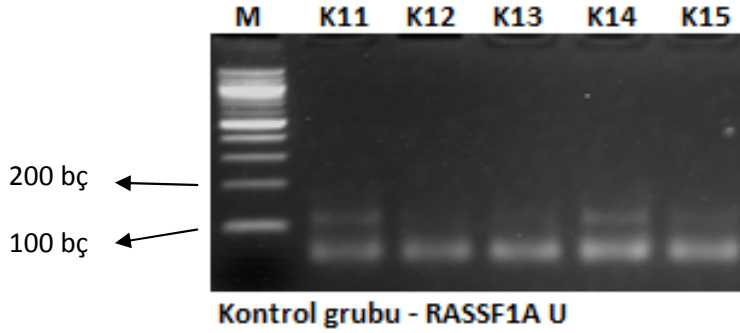
Şekil 4.8. Hasta grubuna ait *RASSF1A* M amplifikasyon sonuçları. T (Tümör doku). M (100 bç markır).



Şekil 4.9. Hasta grubuna ait *RASSF1A* U amplifikasyon sonuçları. T (Tümör doku). M (100 bç markır).



Şekil 4.10. Kontrol grubuna ait *RASSF1A* M amplifikasyon sonuçları. K (Kontrol). M (100 bç markır).



Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait *RASSF1A* U amplifikasyon sonuçları. K (Kontrol). M (100 bç markır).

RASSF1A geninin promotoru, hasta grubuna ait bireylerin 2/20'sinde (%10,0) metillenmiş, 20/20'sinde (%100,0) metillenmemiş halde bulunmuştur. Kontrol grubuna ait bireylerin ise 14/15'inde (%93,3) metillenmiş ve aynı şekilde 14/15'inde (%93,3) metillenmemiş *RASSF1A* promotor bölgesi olduğu bulunmuştur.

Mide kanseri örneklerinin 1/9'unda (%11,1) metillenmiş, 9/9'unda (%100,0) metillenmemiş; kolorektal kanser örneklerinin 1/10'unda (%10,0) metillenmiş, 10/10'unda (%100,0) metillenmemiş *RASSF1A* promotor bölgesi belirlenmiştir. Özefagus kanseri olan bir kişide ise *RASSF1A* promotor bölgesinin metillenmemiş olduğu bulunmuştur.

Hasta ve kontrol gruplarına ait bireyler arasındaki *RASSF1A* promotor bölgesi metilasyonu farklılığı anlamlı bulunamamıştır. Hasta grubundaki sadece iki bireyde gözlenen metilasyon varlığı istatistiksel analiz açısından da yetersiz kalmıştır.

5. TARTIŞMA

İnsan genomundaki promotor bölgelerinin metilasyonu ve global hipometilasyon çoğu kanserde meydana gelen ortak özelliklerdir. Tümör baskılayıcı genlerin CpG adalarındaki metilasyon, ilgili genin ifadesini baskılayarak kanser oluşumunu başlatıp devam ettirebilir (Yuan et al., 2005; Leonhardt and Cardoso, 2000). Kanser oluşumu sırasında meydana gelen genetik değişikliklerin belirlenmesi, tümörün tiplendirilmesinde ve tedavide nasıl bir yol izleneceğine yardımcı olmaktadır (Leonhardt and Cardoso, 2000).

DNA metilasyonu, tümör oluşumunun erken evrelerinde meydana gelen epigenetik bir değişikliktir (Jones and Baylin, 2002). Tümörün erken evrelerinde meydana gelen bu tip epigenetik değişikliklerin, kanserin teşhisinde kullanılabilecek moleküler belirteçler olduğu düşünülmektedir (Wallner et al., 2006). Literatürde pek çok tümör belirteci adayının araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak sonuçlar arasında bir standardın olmaması nedeniyle gastrointestinal kanserler için klinikte uygulanabilen tek bir belirteç yoktur. Bazı belirteçler kanserlerin erken evrede saptanmasını sağlayacak derecede özgül olmadıkları için, bazıları da benign yapılarla kanseri ayırt edebilecek şekilde özgül olmadıkları için tercih edilmemektedirler (Khair et al., 2007).

Gastrointestinal sistem tümörleri en sık görülen kanser tiplerinden biridir. Beslenme, genetik özellikler, tütün kullanımı, obezite ve iltihaplı kolorektal hastalıklar gastrointestinal kanserlerin meydana gelmesine neden olabilecek risk faktörleridir. Gastrointestinal kanserlerin oluşmasında görev alan epigenetik faktörler birçok tümör baskılayıcı geni etkilemektedir. *p16*, *APC* gibi tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerinde meydana gelen hipermetilasyon oranının kolorektal kanserli hastalarda arttığı rapor edilmiştir. Hipermetilasyon sonucu gen ifadesi baskılanan tümör baskılayıcı genler hücre döngüsü boyunca görevlerini yerine getiremedikleri için, hücrenin tümör oluşumuna doğru bir yol almasına neden olurlar (Xu et al., 2004).

Tez çalışmasının amacı, gastrointestinal kanserli hastalardan alınan doku örnekleri kullanılarak, tümör baskılayıcı olan *APC*, *p16* ve *RASSF1A* genlerinin metillenip metillenmediğini MSP yöntemi ile analiz etmektir.

Tez çalışması kapsamında gastrointestinal kanserli hastalardan alınan doku örnekleri kullanılarak, tümör baskılayıcı genlerden olan *APC*, *p16* ve *RASSF1A* genlerindeki metilasyon profilleri MSP yöntemi ile araştırılmıştır. Gastrointestinal kanseri klinik tanılı 20 hasta birey ve kontrol grubu olarak 15 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin moleküler analiz sonuçları Çizelge 4.3 ve 4.6'da yer almaktadır.

İzole edilen DNA'lar, bisülfid dönüşümüne tabi tutulmuş ve MSP analizlerinde kullanılan primerlerin bisülfid dönüşümü gerçekleşmiş olan DNA'ya bağlanacak şekilde tasarlanmasına dikkat edilmiştir. Deney şartlarından kaynaklanan bir hatayı en aza indirmek için her bir PZR analizi en az üç kez tekrar edilmiştir.

Tez çalışmasında, *p16* amplifikasyon ürünlerinin değerlendirilmesi sonucunda hasta grubunda %30 oranında (6/20) metillenmiş promotor bölgesi görülmüştür. Kontrol grubundaki bireylerde ise metilasyon görülmemiştir (Çizelge 4.3). *p16* metilasyonu açısından hasta ve kontrol grupları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0,013$) (Çizelge 4.1). Bunun yanı sıra hem hasta grubunun (18/20) hem de kontrol grubunun (13/15) büyük bir çoğunluğunda *p16* U primerleri ile yapılan amplifikasyonlar pozitif sonuç vermiştir. Tümör dokusunun farklı fenotipe/genotipe sahip hücreler içerdiği düşüncesi bu sonucu doğrulamaktadır. Kontrol grubunda ise *p16* geni promotorunun metillenmemiş olması yani ifadesinin baskılanmamış olması beklenmiş ve gözlenmiştir.

Tümör evresi ile *p16* metilasyonu arasındaki fark ise anlamlı bulunamamıştır ($p=0,599$). Çalışma kapsamında bir tane özefagus tümör örneği kullanıldığı için, bu örnek hesaplama dışında bırakılarak sadece mide ve kolorektal tümörler ile *p16* metilasyonu arasındaki fark istatistiksel olarak analiz edilmiş, fakat anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (Çizelge 4.2).

Yaş ile *p16* metilasyonu karşılaştırıldığında sonuç anlamlıdır ($p=0,025$). Fakat, yaşı 60'tan küçük olan bireylerde %66,7 oranında (4/6) *p16* metilasyonu gözlenmiştir. Yaşın ilerlemesiyle birlikte kanserin meydana gelme olasılığının arttığı ve buna neden olan faktörlerden, metilasyon sıklığında artış olduğu rapor edilmiştir (Finkel et al., 2007). Tez çalışmasında bu durumun tam tersinin

gözlenmesine, çalışmada kullanılan birey sayısının azlığının neden olduğu düşünülmektedir.

Hasta ile kontrol grubu ve tümörün lokalizasyonu, evresi ve hasta bireylerin yaşı gibi verilerle *p16* U primer dizisinin verdiği sonuçlar arasında hiçbir anlamlı ilişki bulunamamıştır (Çizelge 4.3).

Literatürde *p16* geni ile yapılan çalışmaların bazılarında kolorektal kanserli hastaların *p16* proteinini aşırı derecede ifade ettiğini, bazılarında ise *p16* metilasyonunun yüksek olduğu rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada ise *p16* metilasyon oranı sağlıklı dokuda %9,5, tümör dokusunda ise %42,9 şeklinde bulunmuştur (Kim et al., 2005).

Yapılan bir çalışmada, yoğun olarak *p16* metilasyonu gözlenen hücrelerdeki *p16* geninin mRNA'sı ve aynı şekilde *p16* protein oranı çok düşük bulunmuştur. Hipermetilasyonun artışı ile birlikte gen ifadesinde azalma görülmüştür. Aynı çalışmada, hipermetilasyonunun geni sessizleştirmede, aksine gen sessizleşmesinin ilk önce meydana geldiği ve epigenetik olayların bunu takip ettiği ve daha sonra her iki olayın birbirlerini etkileyerek tümör oluşumuna neden oldukları fikri savunulmuştur (Hinshelwood et al., 2009). Hücre döngüsünün anahtar genlerinden biri olan *p16* geninin promotor bölgesinin metillenmesinin tümör oluşumundaki önemli olaylardan biri olduğu düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında da bu bilgiyi doğrulayacak şekilde, sadece hasta grubunda metilasyon varlığı gözlenmiştir.

Literatürdeki çalışmalarda bulunan *APC* hipermetilasyon oranı oldukça yüksektir. Cho ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada göğüs kanseri hastalarının tümör dokularında %52,5 oranında *APC* promotor bölgesi metilasyonu gözlenirken, kontrol grubu olarak kullandıkları beyaz kan hücrelerinde metilasyona dair bir kanıt bulunamamıştır (Cho et al., 2010). Mide kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada ise %82,5 oranında (33/40) *APC* metilasyonu gözlenmiştir (Tsuchiya et al., 2000). Tez çalışmasında ise tümör örneklerinin %50'sinde metilasyon gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise metilasyon varlığına dair kanıt bulunamamıştır. *APC* metilasyonu açısından hasta ve kontrol grubu arasındaki farkın anlamlı olduğu bulunmuştur ($p=0,008$). Bunun yanı sıra hem hasta grubunun (16/20) hem

de kontrol grubunun (10/15) büyük bir çoğunluğunda *APC* U primerleri ile yapılan amplifikasyonlar pozitif sonuç vermiştir. Tümör dokusunun farklı fenotipe/genotipe sahip hücreler içerdiği veya tümör dokusuna karışan sağlıklı hücrelerin bulunması düşüncesi bu sonucu doğrulamaktadır. Kontrol grubunda ise *APC* geninin metillenmemiş olması yani ifadesinin baskılanmamış olması beklenmiş ve gözlenmiştir.

Tümör lokalizasyonuna göre *APC* metilasyonu açısından da fark bulunmuştur ($p=0,007$). Çalışma kapsamında bir tane özefagus tümör örneği kullanıldığı için, bu örnek hesaplama dışında bırakılarak sadece mide ve kolorektal tümörler ile *APC* metilasyonu arasındaki fark istatistiksel olarak analiz edilmiştir ve mide tümörlerinde %88,9 oranında metilasyon varken, kolorektal tümörlerde %20 oranında metilasyon bulunmuştur ($p=0,003$) (Çizelge 4.5). Yapılan bir çalışmada *APC* promotor metilasyonunun mide kanseri hastalarında sıklıkla meydana geldiği belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan sağlıklı mide dokusu örneklerinde *APC* promotor metilasyonu gözlenmiştir. Fakat bu metilasyonunun sadece bir allele meydana geldiği, kanser oluşumu ile birlikte metilasyon oranının arttığı belirtilmiştir (Clement et al., 2004).

Yaş ile *APC* metilasyonu karşılaştırıldığında sonuç anlamlı değildir ($p=0,405$). Yaş ile birlikte metilasyon oranının da artması beklenirken anlamlı bir sonuç elde edilememesine, çalışmada kullanılan birey sayısının azlığının neden olduğu düşünülmektedir. Hasta ile kontrol grubu ve tümörün lokalizasyonu, evresi ve hasta bireylerin yaşı gibi verilerle *APC* U primer dizisinin verdiği sonuçlar arasında hiçbir anlamlı ilişki bulunamamıştır (Çizelge 4.6).

Literatürdeki bir çalışmada metastazik kolorektal tümörlerinde *APC* promotor metilasyonunun arttığı ve buna bağlı olarak *APC* proteininin hücrelerde azaldığı belirlenmiştir. Metastaz yapılan bölgede *APC* proteininin seviyesinde herhangi bir azalma gözlenmemiştir. Bunun sonucunda, metastaz yapan kanser hücrelerinin gittikleri yerlerde genetik ve epigenetik değişikliklere karışık bir şekilde maruz kaldıkları ve böylece *APC* ifadesinden bağımsız olarak *APC* promotor metilasyonu meydana getirebilecekleri düşünülmüştür (Chen et al., 2005). Tez kapsamında yapılan deneyler sonucunda *p16*'da olduğu gibi *APC* genindeki hipermetilasyon

oranının kanser oluşumu ile birlikte arttığı sonucuna varılmıştır. Tümör baskılayıcı bir gen olan *APC*'nin (Aoki and Taketo, 2007) promotor bölgesinin metilasyonu, gen ürününün baskılanmasına neden olup hücre döngüsünde işlev görmesini engelleyip böylece hücrenin kanser oluşumuna doğru yol almasını sağladığı düşünülmektedir.

Tez çalışmasındaki üçüncü gen olan *RASSF1A*'nın amplifikasyon ürünlerinin değerlendirilmesi sonucu hasta bireylerin %10'unda (2/20) metilasyon gözlenirken kontrol bireylerinin de %93,3'ünde (14/15) metilasyon gözlenmiştir. Aynı zamanda bütün hasta bireylerin ve kontrol bireylerinin %93,3'ünde (14/15) *RASSF1A* U sonuçları pozitifdir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Literatürdeki çalışmalarda bulunan *RASSF1A* hipermetilasyon oranı oldukça yüksektir. Sakamoto ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, kolorektal tümör örneklerinde %81,3 oranında (39/48) *RASSF1A* metilasyonu gözlenmiştir (Sakamoto et al., 2004). Aynı şekilde başka bir çalışmada ise göğüs kanseri hastalarından alınan tümör örneklerinde %82,5 oranında (33/40) *RASSF1A* metilasyonu bulunmuştur (Cho et al., 2010). Literatürdeki çalışmaları göz önünde bulundurarak tez çalışmasındaki tümör örneklerinde de *RASSF1A* promotor bölgesi metilasyonunun yüksek olması beklenmekteydi. Çünkü diğer tümör lokalizasyonlarından farklı olarak, *RASSF1A*'nın gastrointestinal kanserlerde daha sık metilasyona uğradığı rapor edilmiştir (Sakamoto et al., 2004). Fakat hasta grubundaki metilasyon oranının çok düşük olup kontrol grubunda bu oranın artması amplifikasyon ürünlerinin özgül olmadığı sonucuna götürmüştür. Primerlerin tasarlanması sırasında dikkat edilecek hususlardan bir tanesi, çoğaltılmak istenen bölgedeki metilasyon farklılığına uygun olan dizileri seçmektir. Primerler genellikle CG dinükleotitlerinin bulunduğu bölgelerden seçilip bu dinükleotitler primer dizisinin 3' ucuna gelecek şekilde ayarlanmaktadır. Literatürdeki bir çalışmadan doğruluğu sınanmış olan primer dizileri tez çalışmasında kullanılmak üzere alınmıştır (Xu et al., 2004). Fakat yapılan deneyler sonucunda U ve M primer çiftlerinin verdikleri amplifikasyon ürünlerinin değişken olduğundan yola çıkılarak, genomda başka yerlere de bağlandığı blast yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yanlış bir sonuçtan kaçınmak için her bir PZR analizinin çok sayıda tekrarı gerçekleştirilmiştir.

Hasta grubunda *RASSF1A* geninin metilasyonu açısından anlamlı bir yorum çıkarılamadığı için diğer karşılaştırmalarla ilgili istatistiksel analizler yapılmamıştır.

Tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgesinde meydana gelen metilasyon profillerini belirleyebilmek için var olan yöntemlerden en verimli olanının seçilip yapılması ileriki çalışmalar için önemlidir. En önemli hastalıklardan biri olan kanserin teşhisinde tümör belirteci olarak promotor bölgesi metilasyonunun belirlenmesiyle ilgili yapılacak olan kapsamlı çalışmaların, önemli bilgileri ortaya çıkaracağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Aguirre-Arteta, A. M., 2000, Regulation of DNA methylation during development: alternative isoforms of DNA methyltransferase, p10.
- Allis, C. D., Jenuwein, T., Reinberg, D., Caparros, M-L., 2007, Epigenetics, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Aoki, K., Taketo, M. M., 2007, Adenomatous polyposis coli (*APC*): a multi-functional tumor suppressor gene, *Journal of Cell Science*, 120: 3327-3335.
- Arbeev, K. G., Ukraintseva S. V., Arbeeva, L. S., Yashin, A. I., 2005, Mathematical models for human cancer incidence rates, *Demographic Research*, 12: 237-272.
- Azuara, D., Rodriguez-Moranta, F., de Oca, J., Soriano-Izquierdo, A., Mora, J., Guardiola, J., Biondo, S., Blanco, I., Peinado, M. A., Moreno, V., Esteller, M., Capella, G., 2010, Novel methylation panel for the early detection of colorectal tumors in stool DNA, *Clinical Colorectal Cancer*, 9(3): 168-176.
- Bigbee, W., Herberman, R. A., 2003, Tumor markers and immunodiagnosis, *Cancer Medicine* 6th ed., BC Decker Inc.
- Bozetti, F., Gianotti, L., Braga, M., Di Carlo, V., Mariani, L., 2007, Postoperative complications in gastrointestinal cancer patients: The joint role of the nutritional status and the nutritional support, *Clinical Nutrition*, 26: 698-709.
- Chen, J., Röcken, C., Lofton-Day, C., Schulz, H-U., Müller, O., Kutzner, N., Malfertheiner, P., Ebert, P. A., 2005, Molecular analysis of *APC* promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis, *Carcinogenesis*, 26(1): 37-43.
- Cho, Y. H., Yazıcı, H., Wu, H-C., Terry, M. B., Gonzalez, K., Qu, M., Dalay, N., Santella, R. M., 2010, Aberrant promoter hypermethylation and genomic hypomethylation in tumor, adjacent normal tissues and blood from breast cancer patients, *Anticancer Research*, 30: 2489-2496.
- Clark, S. J., Melki, J., 2002, DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party?, *Oncogene*, 21: 5380-5387.
- Clement G., Bosman, F. T., Fontollet, C., Benhattar, J., 2004, Monoallelic methylation of the *APC* promoter is altered in normal gastric mucosa associated with neoplastic lesions, *Cancer Research*, 64: 6867-6873.
- Colot, V., Rossignol, J-L., 1999, Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device, *BioEssays*, 21: 402-411.
- Das, P. M., Singal, R., 2004, DNA methylation and cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 22: 4632-4642.

- Esteller, M., 2005, DNA methylation approaches, methods, and applications, CRC Press.
- Esteller, M., 2003, Cancer epigenetics: DNA methylation and chromatin alterations in human cancer, *New Trends In Cancer For The 21st Century, Advances Experimental Medicine and Biology*, 532: 41p.
- Finkel, T., Serrano, M., Blasco, M. A., 2007, The common biology of cancer and ageing, *Nature*, 448: 767-774.
- Foulds, L., 1954, The experimental study of tumor progression, London Academic Press, Vol I-II.
- Foulkes, W. D., Flanders, T. Y., Pollock, P. M., Hayward, N. K., 1997, The *CDKN2A (p16)* gene and human cancer, *Molecular Medicine*, 3(1): 5-20.
- Goto, T., Mizukami, H., Shirahata, A., Sakata, M., Saito, M., Ishibashi, K., Kigawa, G., Nemoto, H., Sanada, Y., Hibi, K., 2009, Aberrant methylation of the *p16* gene is frequently detected in advanced colorectal cancer, *Anticancer Research*, 29: 275-278.
- Guzman, L. M., Koriyama, C., Akiba, S., Eizuru, Y., Castillo, D., Corvalan, A., Aguayo, F. R., 2007, High frequency of *p16* promoter methylation in non-small cell lung carcinomas from Chile, *Biol. Res.*, 40: 365-372.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2000, The hallmarks of cancer, *Cell*, 100: 57-70.
- Hinshelwood, R. A., Melki, J. R., Huschtscha, L. I., Paul, C., Song, J. Z., Stirzaker, C., Reddel, R. R., Clark, S. J., 2009, Aberrant de novo methylation of the *p16^{INK4A}* CpG islands is initiated post gene silencing in association with chromatin remodelling and mimics nucleosome positioning, *Human Molecular Genetics*, 18(16): 3098-3109.
- Holliday, R., 2006, Epigenetics, A historical overview, *Epigenetics*, 1: 2, 76-80.
- Jaenisch, R., Bird, A., 2003, Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nature Genetics Supplement*, 33: 245-254.
- Jones, P. A., Baylin, S. B., 2002, The fundamental role of epigenetic events in cancer, *Nat. Rev. Genet.*, 3: 415-428.
- Khair, G., Monson, J. R. T., Greenman, J., 2007, Epithelial molecular markers in the peripheral blood of patients with colorectal cancer, *Diseases of the Colon&Rectum*, 50: 1188-1203.
- Kim, B. N., Yamamoto, H., Ikeda, K., Damdinsuren, B., Sugita, Y., Ngan, C. Y., Fujie, Y., Ogawa, M., Hata, T., Ikeda, M., Ohue, M., Sekimoto, M., Monden, T., Matsuura, N., Monden, M., 2005, Methylation and expression of *p16^{INK4}* tumor suppressor gene in primary colorectal cancer tissues, *International Journal of Oncology*, 26: 1217-1226.

- Laird, P. W., 2003, The power and the promise of DNA methylation markers, *Nature Reviews*, 3: 253-266.
- Laird, P. W., Jaenisch, R., 1996, The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics, *Annu.Rev.Genet.*, 30: 441-64.
- Leonhardt, H., Cardoso, M. C., 2000, DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer, *J. Cell Biochem. Suppl.*, 35: 78-83.
- Neyhouser, M. L., 2004, Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human populations studies, *Nutrition and Cancer*, 50(1): 1-7.
- Nowell, P. C., 1976, The clonal evolution of tumor cell populations, *Science*, 194: 23-28.
- Oakeley, E. J., 1999, DNA methylation analysis: a review of current methodologies, *Pharmacology & Therapeutics*, 84: 389-400.
- Ponder, B. A. J., 2001, Cancer genetics, *Nature*, 411: 336-341.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N., 1985, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230: 1350-1354.
- Sakamoto, N., Terai, T., Ajioka, Y., Abe, S., Kobayasi, O., Hirai, S., Hino, O., Watanabe, H., Sato, N., Shimoda, T., Fujii, H., 2004, Frequent hypermethylation of *RASSF1A* in early flat-type colorectal tumors, *Oncogene*, 23: 8900-8907.
- Sayın, D. B., 2008, Metilasyon ve kanser, *Türkiye Klinikleri*, 28: 513-524.
- Schulz, W. A., 2005, *Molecular biology of human cancers*, Springer, p41.
- Schwab, H., 2008, *Encyclopedia of cancer*, Springer, p1016, p1017, p1018, p1019.
- Sharma, S., Kelly, T. K., Jones, P. A., 2010, Epigenetics in cancer, *Carcinogenesis*, 31(1): 27-36.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., Futreal, P. A., 2009, The cancer genome, *Nature*, 458: 719-724.
- Tsuchiya, T., Tamura, G., Sato, K., Endoh, Y., Sakata, K., Jin, Z., Motoyama, T., Usuba, O., Kimura, W., Nishizuka, S., Wilson, K. T., James, S. P., Yin, J., Fleisher, A. S., Zou, T., Silverberg, S. G., Kong, D., Meltzer, S. J., 2000, Distinct methylation patterns of two *APC* gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia, *Oncogene*, 19: 3642-3646.
- Vineis, P., Berwick, M., 2006, The population dynamics of cancer: a Darwinian perspective, *International Journal of Epidemiology*, 35: 1151-1159.

- Vineis, P., Husgafvel-Pursiainen, K., 2005, Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations, *Carcinogenesis*, 26(11): 1846-1855.
- Vogelstein, B., Kinzler, K. W., 2004, Cancer genes and the pathways they control, *Nature Medicine*, 10(8): 789-799
- Waddington, C. H., 1942, The epigenotype, *Endeavour*, 1: 18-20.
- Wallner, M., Herbst, A., Behrens, A., Crispin, A., Stieber, P., Göke, B., Lamerz, R., Kolligs, F. T., 2006, Methylation of serum DNA is an independent prognostic marker in colorectal cancer, *Clin. Cancer Res.*, 12(24): 7347-7352.
- Weinberg, R. A., 2007, *The biology of cancer*, Garland Science, p43, p44, p45, p226, p227, p228, p229, p231, p399, p400, p404, p406, p408, p409, p414, p415.
- Widschwendter, M., Menon, U., 2006, Circulating methylated DNA: A new generation of tumor markers, *Clin. Cancer Res.*, 12(24): 7205-7208.
- Wong, J. J. L., Hawkins, N. J., Ward, R. L., 2007, Colorectal cancer: A model for epigenetic tumorigenesis, 56: 140-148.
- Xu, X-L., Yu, J., Zhang, H-Y., Sun, M-H., Gu, J., Du, X., Shi, D-R., Wang, P., Yang, Z-H., Zhu, J-D., 2004, Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis, *World Journal of Gastroenterology*, 10(23): 3441-3454.
- Yen, M. Y., Yen, T., Panc, C., Liu, J., Wei, Y., 1992, Mitochondrial DNA mutation in Leber's Hereditary Optic Neuropathy, *Invest. Opht. Visual Sci.*, 33: 2561-2566.
- Yuan, Y., Liu, H., Sahin, A., Dai, J. L., 2005, Reactivation of SYK expression by inhibition of DNA methylation suppresses breast cancer cell invasiveness, *Int. J. Cancer*, 113: 654-659.

www.who.int

www.kanser.gov.tr

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
ETİK KURUL TOPLANTI RAPORU

OTURUM NO : 109
OTURUM TARİHİ : 06 Mayıs 2008
OTURUM BAŞKANI : Prof. Tbp. Kd. Alb. Ali Uğur URAL
OTURUM SEKRETERİ : Doç. Dr. Ecz. Kd. Alb. Adnan ATAÇ

GATA Etik Kurulu'nun 06 Mayıs 2008 günü yapılan 109. oturumunda, GATA Gastroenteroloji BD'dan Uzm. Tbp. Yb. Zülfikar Polat'ın sorumlu araştırmacılığını yaptığı "**Gastrointestinal Kanser Hastalarında Tümör Belirteçlerinin Saptanmasında Metilasyon-Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MSP) ve Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemlerinin Karşılaştırılması**" başlıklı, çok merkezli, tanı geliştirme çalışması olan araştırma dosyası değerlendirildi.

Araştırma dosyasının amaç, yöntem ve yaklaşım bakımından etik ilkelere UYGUN olduğuna karar verildi.

BAŞKAN

Ali Uğur URAL
Prof.Tbp.Kd.Alb.

ÜYE

Ali İhsan UZAR
Prof.Hv.Tbp.Kd.Alb.

ÜYE

Ayhan KUBAR
Prof.Tbp.Kd.Alb.

ÜYE

T. HAZNEDAROĞLU
Tunçer HAZNEDAROĞLU
Prof.Dz.Tbp.Alb.

ÜYE

Adnan ATAÇ
Doç.Dr.Ecz.Kd.Alb.

ÜYE

Mükerrem SAFALI
Doç.Tbp.Kd.Alb.

ÜYE

K. Melih AKAY
Doç.Tbp.Kd. Alb.

ÜYE

Mustafa ÖZER
Doç.Tbp.Alb.

ÜYE

Ergun TOZKOPARAN
Doç. Tbp. Alb.

ÜYE

Toplantıda Raportör
Nalan AKBAYRAK
Prof. Dr. Sağ. Yb.

ÜYE

Muharrem UÇAR
Yrd.Doç.J.Tbp.Yb.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Beril Erdem

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1985

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise 2000-2003 Fatih Sultan Mehmet Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)

Lisans 2003-2008 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi:

2010- Hacettepe Üniversitesi'nde Araştırma Görevlisi