

70553

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EPİTELYAL KANSERLERDE
TRANSFORMİNG GROWTH FAKTÖR BETA
RESEPTÖR II GENİ (TGF- β RII)
MİKROSATELLİT İNSTABİLİTESİNİN BELİRLENMESİ**

**SEFA KIZILDAĞ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

70553

**İZMİR
1998**

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EPİTELYAL KANSERLERDE
TRANSFORMİNG GROWTH FAKTÖR BETA
RESEPTÖR II GENİ (TGF- β RII)
MİKROSATELLİT İNSTABİLİTESİNİN BELİRLENMESİ**

**SEFA KIZILDAĞ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. MERAL SAKIZLI**

**İZMİR
1998**

“Epitelyal kanserlerde Transforming growth faktör beta reseptör II geni (TGF β -RII) mikrosatellit instabilitesinin belirlenmesi” isimli tez 26.06.1998 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.



Jüri Başkanı

Prof.Dr. Meral SAKIZLI



Jüri Üyesi

Doç.Dr. Neşe ATABEY



Jüri Üyesi

Doç.Dr. Sülen SARIOĞLU

TEŐEKKÜR

Tez çalıŐmalarımı yűrűtebilmem için bana her tűrlű olanađı sađlayan, çalıŐmanın her aŐamasında yakın ilgi, destek ve katkısı bulunan danıŐmanım, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı baŐkanı Prof. Dr. Sayın Meral Sakızlı'ya, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalının deđerli űđretim űyelerine, çalıŐmalarım sırasında emeđi geçen meslektaŐlarım Dr. Kemal S. Korkmaz ve Dr.H.Ogűn Sercan'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalındaki alıŐma arkadaŐlarıma, tez materyalinin sađlanmasında ve deđerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı űđretim űyeleri Doç. Dr. Sűlen Sarıođlu'na ve Dr. Erdener Őzer'e anlayıŐ destek ve yardımlarından dolayı teŐekkűrű borç bilirim.

Ayrıca; her zaman sevgisini ve desteđini yanımda bulduđum eŐim Servet Kızıldađ'a ve aileme teŐekkűr ederim.

Sefa KIZILDAĞ

Haziran 1998

İÇİNDEKİLER

A.	ÖZET	I
B.	İNGİLİZCE ÖZET	II
C.	Şekil listesi	III
D.	Tablo listesi	IV
E.	Resim listesi	V
1.	GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.	GENEL BİLGİLER	4
2.1.	Transforming Growth Faktör Beta (TGF β)	4
2.2.	Latent TGF β Aktivasyonu	6
2.3.	TGF β ve Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi	7
2.4.	TGF β Reseptörleri	11
2.4.1.	TGF β -RI	11
2.4.2.	TGF β -RII	11
2.4.3.	TGF β -RIII	12
2.5.	Tekrarlayan DNA Dizileri	12
2.6.	Mutatör Fenotip ve Kanser	14
2.6.1.	HNPCC ve Mutatör Fenotip	15
2.7.	Mismatch Onarımı (MMR)	16
2.8.	Mikrosatellit İnstabilite ve Karsinogenez	19
2.8.1	Mikrosatellit İnstabilitesi ve TGF β -RII	20
2.9.	Kolon Kanserleri ve TGF β -RII Mikrosatellit İnstabilitesi	22
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
3.1.	Genel Bilgi	24
3.2.	Örnekler	25
3.3.	Yöntemler	25
3.3.1.	DNA İzolasyonları	25
3.3.1.1.	Dokudan DNA İzolasyonları	25
3.3.1.2.	Parafin Blok Kesitlerinden DNA İzolasyonları	26
3.3.2.	DNA Elektroforezi	27
3.3.3.	PCR Reaksiyonları	27

3.4.	Denatüran Poliakrilamid Jel Elektroforezi	28
3.4.1.	Cam Levhaların Hazırlığı	28
3.4.2.	Jelin Hazırlığı	29
3.4.3.	Jelin Cam Levhaya Dökülmesi	29
3.4.4.	Elektroforez Sisteminin Hazırlanışı ve Örneklerin Denatürasyonu	29
3.5.	Gümüş Boyama	30
3.6.	Fotoğraflama	30
3.7.	Solüsyonlar	31
3.8.	Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Gerçler	34
3.8.1.	Kullanılan Gereçler	34
3.8.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	34
4.	BULGULAR	36
4.1.	DNA Elektroforezi	38
4.2.	PCR Amplifikasyonları	39
4.3.	Poliakrilamid Jel Elektroforezi	40
5.	TARTIŞMA	44
6.	KAYNAKLAR	52

A. ÖZET

EPİTELYAL KANSERLERDE TRANSFORMİNG GROWTH FAKTÖR BETA RESEPTÖR II GENİ (TGF- β RII) MİKROSATELLİT İNSTABİLİTESİNİN BELİRLENMESİ

Sefa KIZILDAĞ

Anahtar Kelimeler

Kolorektal kanser, Bilateral meme kanseri, TGF β -RII, MIN

Epitelyal dokularda transforming growth faktör beta (TGF β), transforming growth faktör beta reseptör II (TGF β -RII) ye bağlanarak büyümeyi durdurur. Genomik instabilite gösteren insan kolon ve mide kanserlerinde, TGF β -RII geninin polinükleotid tekrar bölgesinde p(A)₁₀ çerçeve kayması mutasyonları tanımlanmıştır. Bu tip mutasyonlar kısalmış reseptör proteinin sentezlenmesine neden olur ve serin-treonin kinaz aktivitesi gösteren reseptörün aktivitesini durdurarak, TGF β ya dirençli hücrelerin oluşumuna neden olurlar. TGF β ya dirençli bu tip hücreler durmaksızın proliferasyona uğrayarak kanser oluşumuna neden olurlar.

Araştırmamızda 41 epitelyal kanserin (15 kolorektal kanser ve 26 bilateral meme kanseri) DNA izolasyonları yapıldı ve TGF β -RII genine özel primerlerle 73 bp lik p(A)₁₀ tekrarı içeren bölge, PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonu ile çoğaltılan izole DNA lar %8 lik poliakrilamid jel (8M üreli) de yürütüldü ve gümüş boyama ile görüntülendi. Analizi yapılan 15 kolorektal olgunun hiçbirinde ve 26 bilateral meme tümörünün sadece bir tanesinde TGF β -RII geninde instabilite saptanmıştır (%3.84).

B. SUMMARY

TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA RECEPTOR II GENE (TGF β -RII) MICROSATELLITE INSTABILITY IN EPITHELIAL CANCER

Sefa KIZILDAĞ

Key Words

Colorectal cancer, Bilateral Breast cancer, TGF β -RII, MIN

Transforming growth factor beta (TGF β) is a potent inhibitor of epithelial cell growth. TGF β actions are mediated by binding to heteromeric complexes of transforming growth factor beta receptor type I (TGF β -RI) and transforming growth factor beta receptor type II (TGF β -RII). Frameshift mutations of the polyadenine repeat region p(A)₁₀, in the TGF β -RII gene, were shown to exist in gastric and colon cancer associated with microsatellite instability (MIN). These mutations result in truncated proteins with abolished serin threonine kinase activity. Cells gain resistance to TGF β actions and escape from TGF β mediated growth control, contributing to carcinogenesis.

Forty-one epithelial cancer specimens (15 colorectal cancer and 26 bilateral breast cancer) were analysed for mutations of simple repeated sequences in the TGF β -RII. After DNA isolation, the polyadenin region in the TGF β -RII gene was amplified by PCR, using specific primers. The amplification products were run on polyacrilamide gels (with 8M urea) and visualised by silver staining.

P(A)₁₀ mutations were not detected in any of the colorectal cancer samples and only 1 out of the 26 bilateral breast cancer samples showed allelic shifts representing MIN (%3.84).

C. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 :	TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3 prekürsör proteinleri	5
Şekil 2 :	TGFβ'nın küçük ve büyük latent kompleksi	6
Şekil 3 :	Siklin D/cdk4 ve Siklin E/cdk2 komplekslerinin R noktası inhibisyonu	8
Şekil 4 :	E2F transkripsyon faktörü ve c-abl'nin pRb nin aktivasyonundaki rolü	9
Şekil 5 :	TGFβ inhibisyon sinyal yolları	10
Şekil 6 :	Mismatch tamir mekanizması	19



D. TABLO LİSTESİ

Tablo 1 :	Cdk inhibitörleri	9
Tablo 2 :	PCR'da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları	28
Tablo 3 :	Gümüş boyama prosedürü.	30
Tablo 4 :	Kolorektal DNA saflık ve miktarları.	37



E. RESİM LİSTESİ

- Resim 1 :** %1 lik etidyum bromidli agoroz jelde yürütülmüş kolorektal doku DNA'ları. 38
- Resim 2 :** %1 lik etidyum bromidli agoroz jelde yürütülmüş bilateral meme dokusu DNA ları. 39
- Resim 3 :** %2 lik etidyum bromidli agoroz jelde 73 bp lik TGF β -RII amplifikasyon örnekleri. 40
- Resim 4 :** Dokuz kolorektal tümörde TGF β -RII mikrosatellit markeri ile yapılan analizlerde normal sonuçlar görülmektedir. 40
- Resim 5 :** Altı kolorektal tümörde TGF β -RII mikrosatellit markeri ile yapılan analizlerde normal sonuçlar görülmektedir. 41
- Resim 6 :** Üç bilateral meme tümöründe TGF β -RII mikrosatellit markeri ile yapılan analizlerde normal sonuçlar görülmektedir. 41
- Resim 7 :** Altı bilateral meme tümöründe TGF β -RII mikrosatellit markeri ile yapılan analizlerde,6 no.lu olguda instabilite sonuçları görülmektedir 42
- Resim 8 :** Sekiz bilateral meme tümöründe TGF β -RII mikrosatellit markeri ile yapılan analizlerde normal sonuçlar görülmektedir 42
- Resim 9 :** Altı bilateral meme tümöründe TGF β -RII mikrosatellit markeri ile yapılan analizlerde normal sonuçlar görülmektedir 43
- Resim 10 :** Altı bilateral meme tümöründe TGF β -RII mikrosatellit markeri ile yapılan analizlerde normal sonuçlar görülmektedir. 43

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Çok eski çağlardan beri insanlar kanseri oluşturan nedenleri öğrenmeye çalışmışlardır. Özellikle XVIII. Yüzyıldan sonra, insan kanserlerinde dış etkenlerin de rol oynayabileceği anlaşılınca, araştırmacılar bu ajanların saptanması ve etki mekanizmalarının açıklanmasına yönelmiştir. Bugün insanlarda kansere yol açtığı düşünülen faktörleri üç ana grupta toplamak mümkündür: Kimyasal ajanlar, virüsler ve genetik faktörler. Çeşitli virüsler, çevresel faktörler (karsinojen kimyasallar, iyonize radyasyon), gen yapısında değişimlere neden olarak ve immünolojik bozukluklar, hücre çoğalmasında, yapısında ve aktivitesinde değişiklikleri tetikleyerek kanser oluşumunu başlatabilirler. Çoğu hastalık çevresel ve genetik (multifaktörial) süreçler neticesinde oluşmaktadır. Böyle birden çok farklı nitelikte ajanların nasıl olup da hücrede aynı biyolojik değişime, yani kanserleşmeye yol açtığı konusu çok geniş tartışmalara neden olmaktadır. Son yıllarda bu olayı açıklamak amacıyla farklı dış etkenlerin hücrede doğuştan var olan genetik mekanizmaları etkilemesine dayanan “birleştirici hipotezler” öne sürülmüştür (De Vita et al. 1997).

Çalışmalar kanserleşmenin hemen her zaman tek bir hücrede başladığını ortaya koymaktadır. Karsinogenezin, pek çok tipinin multi step (çok basamaklı) gelişim gösterdiği ilk kez, Bereblum ve Shubik tarafından 1947 yılında fare epidermal kanserlerinde gösterilmiştir. Buna göre, bir ajanın etkisiyle başlayan kanser gelişimi, ikinci bir etkenin ve zaman içerisinde daha başka faktörlerin de etkisi ile ilerler (Rooney et al. 1991).

Bir hücrenin, neoplastik bir hücreye dönüşümünde rol alan temelde iki grup gen tanımlanmıştır. Bunlar; onkogenler ve tümör süpresör (baskılayıcı) genlerdir. Onkogenler, protoonkogen olarak bilinen, normal hücre çoğalma ve farklılaşmasında görev alan genlerin, çeşitli etkenlerle oluşan mutasyonlar sonunda aktive olmuş formlarıdır. Tümör süpresör genler ise, anormal hücre gelişimi ve malign transformasyonu baskılayıcı özelliğe sahiptir. Bu genlerde çeşitli mekanizmalarla meydana gelen allel kaybı, delesyon, mutasyon ve bunların sonucunda ortaya çıkan aktivite kaybı, tümör gelişimine yol açabilir (De Vita et al. 1997).

Normal bir epitel hücresinde oluşan mutasyon, neoplastik formdaki çok sayıdaki mutasyonu açıklayabilmek için yeterli değildir. Araştırmacılar kanser hücresinde oluşan bu çok sayıdaki mutasyonu açıklamak için “mutatör fenotip” hipotezini ileri sürmüşlerdir. Mutatör fenotip hipotezi, normal biyolojik işlevli bir hücrede oluşan mutasyonun, hücrenin

spontan mutasyon hızının artmasına yol açabileceğini, böylelikle bir mutasyon birikiminin oluşabileceğini ileri sürmektedir (Loeb et al. 1994, Tomlinson et al. 1996, Bodmer et al. 1996). Bu tür mutator mutasyonların DNA tamir mekanizmalarında, DNA polimeraz enziminde ve/veya hücre siklusunda rol alan genlerde olabileceği, böylece replikasyon hatalarındaki artış ve oluşan DNA modifikasyonlarının tamir edilememesi sonucu hücrenin spontan mutasyon hızının arttığını belirtmişlerdir. Genellikle erken yaşta ve ailesel görülen bu tip tümörlerde yaygın replikasyon hatalarının göstergesi olan mikrosatellit sekanslarda bir instabilite (düzensizlik) gözlenmektedir (Wooster et al. 1994, Chung et al. 1996).

Transforming Growth Faktör beta (TGF- β) birçok hücre tipinde büyümeyi düzenleyen ve farklılaşmadan sorumlu bir sitokindir (Antonia et al.1996). TGF- β , mezansimal orjinli hücrelerde hücre proliferasyonunu stimule ederken, epitelyal orjinli dokularda ise proliferasyonu inhibe eder (Levine et. al 1992, Clark et al. 1996). TGF- β , neoplastik olmayan epitelyal hücrelerde, kompleks sinyal mekanizmalarına etki ederek hücre siklusunun G₁ den S fazına ilerlemesini inhibe eder (Alexandrow et al. 1995). TGF- β hücre proliferasyonunu inhibe edici etkisini, hücre yüzeyinde bulunan iki reseptörünün oluşturduğu heteromerik komplekse bağlanarak gösterir. Bu reseptörler, Transforming growth faktör reseptör I (TGF β -RI) ve Transforming growth faktör reseptör II (TGF β -RII) dir (Myeroff et al. 1995, Parsons et al. 1995, Markowitz et al. 1995, Marx et al. 1995). TGF β -RI, TGF β -RII'nin yokluğunda TGF β 'yı bağlayamaz (Parsons et al. 1995). Çeşitli neoplastik hücre hatları ve tümör dokularıyla yapılan çalışmalarda, TGF β -RII geninde çeşitli "hot-spots" (mutasyona açık) bölgeler tanımlanmıştır. Bu bölgelerden ilki, TGF β -RII geninin 3.eksonunda 125-128 kodonları arasında bulunan 10 adenin tekrarını içeren bölgedir. İkinci "hot-spot" nokta ise 7. eksonda bulunan 513-514 ve 532-534 kodonları arasında bulunan GT₃ tekrar bölgesidir (Togo et al. 1996, Takenoshita et al. 1996, Sauza et al. 1997 Akiyama et al. 1997, Samowitz et al. 1997). Bu "hot-spot" noktalarda oluşan herhangi bir mutasyon sonucunda, TGF β -RII proteininin transkripsiyonu erken sonlanmaktadır. Transkripsiyonu erken sonlanan TGF β -RII proteininin konformasyonel yapısı değişmekte, böylece TGF β , TGF-RII kompleksine bağlanamamaktadır (Antar et al. 1995). TGF β 'nın hücre reseptörüne bağlanamamasından dolayı, hücre siklusu G1'de inhibe olamaz ve epitelyal hücre hızla proliferer olur (Alexandrow et al. 1995).

Çalışmamızda, epitelyal dokuya örnek olarak kolorektal ve bilateral meme dokuları seçilmiştir. Kolorektal ve bilateral meme dokularından alınan, aynı hastaya ait tümör ve normal doku örneklerinin DNA izolasyonları yapıldıktan sonra, TGF β -RII geninin 3.eksonundaki (A)₁₀ (10 adenin tekrar bölgesi)'ni kapsayan (125- 128. kodonlar) mikrosatellit marker kullanılarak, TGF β -RII geninin 73bp'lik amplifikasyonu PCR (Polimerase Chain Reaction) yöntemi ile çoğaltılmış ve poliakrilamid jel elektroforezi yapılarak, gümüş boyama yöntemi ile görüntülenerek, TGF β -RII geni için mikrosatellit insatabilite varlığının araştırılması amaçlanmıştır.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. TRANSFORMİNG GROWTH FAKTÖR BETA (TGF β)

2.2. LATENT TGF β AKTİVASYONU

2.3. TGF β VE HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN DÜZENLENMESİ

2.4. TGF β RESEPTÖRLERİ

2.4.1. TGF β -RI

2.4.2. TGF β -RII

2.4.3. TGF β -RIII

2.5. TEKRARLAYAN DNA DİZİLERİ

2.6. MUTATÖR FENOTİP VE KANSER

2.6.1. HNPCC VE MUTATÖR FENOTİP

2.7. MİSMATCH ONARIMI (MMR)

2.8. MİKROSATELLİT İNSTABİLİTE VE KARSİNOGENEZ

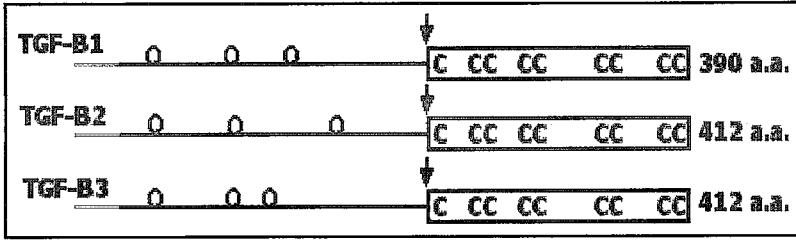
2.8.1. MİKROSATELLİT İNSTABİLİTESİ VE TGF β -RII

2.9. KOLON KANSERLERİ VE TGF β -RII MİKROSATELLİT İNSTABİLİTESİ

2.1. TRANSFORMİNG GROWTH FAKTÖR BETA (TGF β)

İnsanda yapısal olarak üç farklı TGF β proteini klonlanmıştır (Koli et al. 1997, Grady et al. 1997). Yapılan çalışmalarda üç tip TGF β geninin de farklı kromozomlarda lokalize olduğu gösterilmiştir (Gene card for TGF β receptors 1998). Bunlar TGF β 1, TGF β 2 ve TGF β 3 olarak adlandırılmıştır. Her üç tip TGF β proteini, yaklaşık olarak 25kd büyüklüğünde disülfid bağları ile bağlı homodimer yapıda bulunmaktadır (Gold et al. 1994, Mackay et al. 1995, Gene card for TGF β receptors 1998). TGF β 1, TGF β 2, ve TGF β 3 arasındaki aminoasit sekans homolojisi %64 le %82 oranında değişmektedir. Tavuk ve *Xenopus levis* genomundan TGF β 4 ve TGF β 5 proteinleri izole edilmiştir. İnsan ve Tavuk TGF β izoformları arasında %98'e kadar varan aminoasit homolojisi göstermektedir (Levine et al. 1992).

İnsan TGF β proteinleri 390-412 aminoasit uzunluğunda, prekürsör protein olarak sentezlenir. Matür proteini 112 aminoasit uzunluğundadır. Bioaktif domeini c-terminali ucundadır. Homodimer yapıdaki TGF β proteini aynı tipteki iki zincirin biraraya gelmesi ile oluşmuştur. (şekil 1) (Levine et al. 1992)



Şekil 1 : TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3 prkürsör proteinleri (Massague, 1992)

- Kutu: bioaktif domein
- Açık renkli çizgi: Aminoterminal sekans
- O: Glikolizasyon bölgeleri
- Ok: Proteaz kesim noktası
- C: Sistein amino asidi (a.a.)

TGFβ proteinleri, degranüle plateletlerden, makrofajlardan ve T ve B lenfositlerden salgılanırlar. TGFβ proteini, makrofaj ve monositlerin kemotaktik atak, makrofajların IL-1 üretimi, epitelyal, endotelyal, lenfoid ve hemotopoetik hücre proliferasyonunun inhibisyonu, inflamatuvar cevap, yara iyileşmesi ve IgA üretimi olaylarında önemli rol oynar (Levine et al. 1992, Wrana et al. 1994, Clark et al. 1996, De Vita et al 1997).

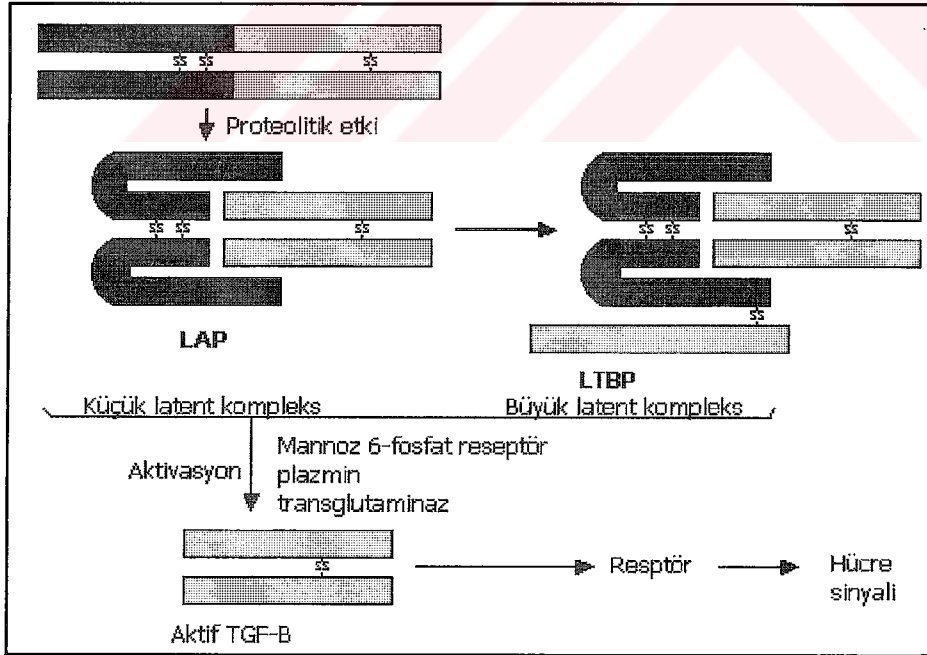
TGFβ izoformları spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak hücrede, ekstra sellüler matriks formasyonunu, hücre büyümesini ve farklılaşma olaylarını regüle ederler. Bir çok çalışmada, farmakolojik olarak TGFβ'nın agonist ve antagonistik etkileri tanımlanmıştır. TGFβ'nın agonistik etkilerine örnek olarak, yara iyileşimi, kıkırdak ve kemik dokusu tamiri, otoimmün hastalıklarda immün sistemin baskılıyıcı yanıtı ve kalp krizini izleyen iskemik hasarın önlenmesi verilebilir. TGFβ'nın antagonistik etkisine örnek olarak fibrotik hastalıkların tedavisindeki kullanımı verilebilir (Clark et al. 1996).

TGFβ'nın üç izoformu farklı 5'-3' "untranslated" (proteine yansımayan) bölgeler ve promotor bölgeler içerirler. Böylelikle bu izoformların, farklı olaylarda ekspresyon miktarları ayarlanmış olur. İskemi, anoksi, karsinogenez ve fibrogenezde TGFβ1 ekspresyonu seçici olarak artarken, TGFβ2 ve TGFβ3 hormonal ve gelişimsel sinyal yollarında görev alır. Bazı aköz ve vitröz sıvılarda, örnek olarak göz, amniyotik sıvı, tükürük ve anne sütünde TGFβ2 daha fazla olarak bulunmaktadır (Clark et al. 1996).

2.2. LATENT TGF β AKTİVASYONU

TGF β hücreden salındıktan sonra reseptöre direkt olarak bağlanamaz. TGF β 'nin reseptöre bağlanabilmesi için aktive olması gerekir. TGF β 'nin büyük ve küçük olmak üzere iki latent formu tanımlanmıştır (Koli et al. 1997). Küçük latent kompleks tek gen ürününün kodlanması ile oluşmuştur. Molekülün C' ucunda 112 aminoasitlik olgun TGF β ve N ucunda LAP (Latency associated protein) bulunur. Büyük latent komplekste bu moleküle ek olarak küçük latent kompleksin N ucuna eklenmiş olarak LTBP (Latent TGF β binding protein) bulunur. LTBP proteini 16 tane epidermal growth faktör tekrarı, 8 tane sistein aminoasit tekrarı, Arg-Gly-Asp aminoasitleri ve hücre bağlayıcı domein olan Laminin B2 den oluşmuştur (Şekil 2) (Clark et al. 1996). Her iki latent kompleksin aktivasyonunda mannoz-6-fosfat reseptörü, plazmin ve transglutaminazlar rol alırlar.

TGF β 'nin diğer bir aktivasyon mekanizması ise kemik dokusunda olan pH'ya bağlı aktivasyon mekanizmasıdır. Invitro çalışmalarda latent TGF β 'nin asidik ortamda aktive olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda, retinoik asit, vitamin D₃, Tamoksifen'in de latent TGF β 'yi aktive ettikleri gösterilmiştir (Croxtall et al. 1992, Clark et al. 1996, Koli et al. 1997).



Şekil 2 : TGF β 'nin küçük ve büyük latent kompleksi (Clark, 1996)

LAP veya LAP/LTBP kompleksi, biglikan, dekarin, tip IV kollajen, fibronektin ve trombospandini içeren matriks proteinleri ile aktive olur. Latent TGF β ekstrasellüler matriks içinde depolanmıştır. Aktif TGF β yokluğunda, ekstrasellüler matriks içinde bulunan latent TGF β proteini aktif formuna dönüştürülerek salınır (Clark et al. 1996).

2.3. TGF β VE HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN DÜZENLENMESİ

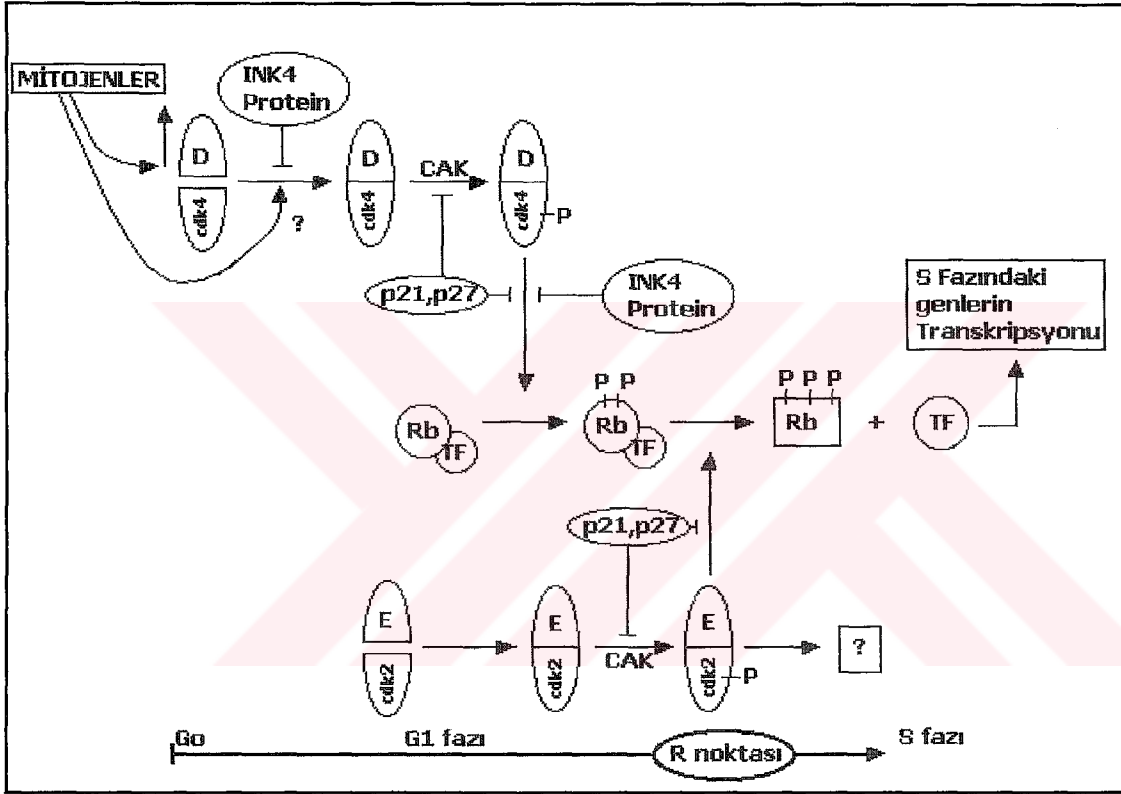
İnsan ve hayvan hücrelerinde DNA genomunun replikasyonu, hücrenin yaşam sürecinde ancak belirli bir dönem içerisinde meydana gelir. Bu evreye “Sentetik” faz (S fazı) denilir. Bu (G1) birinci aralık ve (G2) ikinci aralık fazları arasında yer alır. Hücrenin yaşam döngüsü iki mitotik bölünme arasındaki dönemdir (Mathews et al. 1990). Post mitotik dönem veya istirahat fazı (G1)’de hücrede RNA ve protein sentezi yapılmakta, DNA sentezi olmamaktadır. Sentetik faz (S fazı)’da DNA sentez edilmeye başlar, RNA sentezi devam eder ve protein sentezi ise maksimuma çıkar. Postsentetik faz veya istirahat fazı (G2) de DNA sentezi durur, RNA ve protein sentezi ise, G1 döneminde olduğu kadardır. Bu dönemden sonra, yeni mitotik bölünme evresi gelir (Cooper et al. 1996).

Hücre döngüsünün G₁ fazındaki moleküler olaylar sentetik evre için hücreyi hazırlar. G₁ döngüsündeki kontrolün esası diğer fazdaki moleküler kontrol mekanizmaları gibi tam olarak açıklanamamıştır. G₁ fazı hücre siklusunu için önemli bir evredir. G₁ den S fazına geçişte R noktası (Restriction point) denen bir nokta bulunur. Bu nokta G₁ fazı için kontrol noktasıdır (Pardee et al. 1989, Alexandrow et al. 1995). Hücrede R aşaması geçildikten sonra DNA sentezi başlamaktadır. Epitelyal hücrelerde DNA sentezinin başlaması yaklaşık olarak R aşaması geçtikten, sonra 1-3 saatleri arasında olur. G₁ evresi; erken G₁, R noktasından önce ve geç G₁, R noktasından sonra olmak üzere iki bölümde incelenmektedir (Levine et al. 1992).

Yetişkin bir insan hücresi mitojenik uyarı ile G₁ evresine girdiği zaman D tipi siklinler (D1, D2, D3) yapımı artar ve G₁ evresi boyunca bu siklinlerin yapımı devam eder (Levine et al. 1992, Datto et al. 1995, De Vita et al. 1997). D tipi siklin düzeyinin denetimi hücre dışı uyarılar ile olur. (Şekil 3) D tipi siklinler, cdk4 (cyclin-dependent kinase) veya cdk6 ile haloenzim kompleksi halinde bulunur. Siklin D/cdk4 ve Siklin D/cdk6 kompleksleri kinaz aktivitesi gösterirler. Bu kompleksler, CAK (cdk-activating kinase) tarafından kendi kendine aktive olur. CAK siklin/cdk kompleksi ve siklin H ve cdk7 proteininden oluşmuştur.

CAK, siklin/cdk kompleksini cdk üzerinde bulunan threonin (aminoasit 172) nin fosforilenmesi ile aktive eder (De Vita et al. 1997).

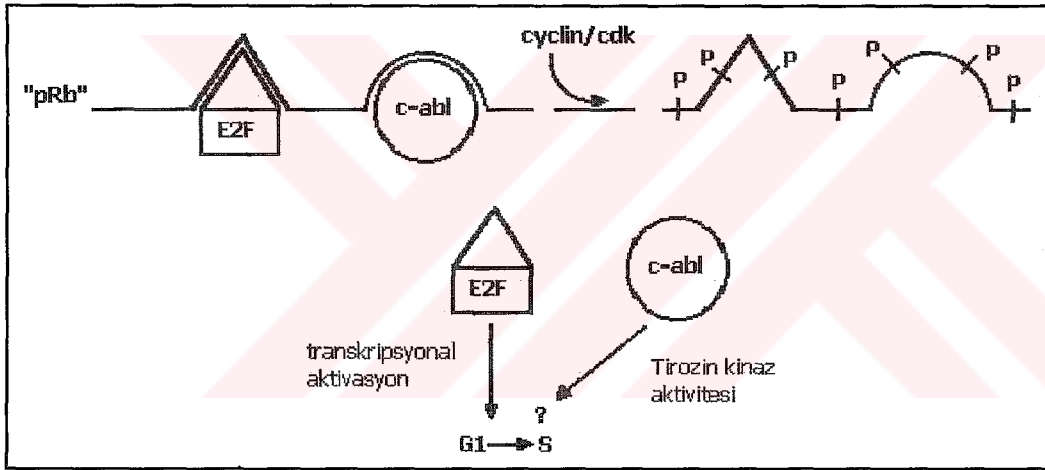
Siklin D/cdk6 veya siklin D/cdk4 kompleksinin aktivasyonu retinoblastoma proteininin (pRb) fosforilasyonuna neden olur. Fosforile olan pRb proteini E2F gibi bağlı bulunduğu transkripsiyon faktörlerini salar. Serbest kalan transkripsiyon faktörleri hücreyi S evresine girmek üzere uyarır (Nevins et. al. 1992, Levine et al. 1992, Datto et al. 1995, Alexandrow et al. 1995, Serra et al. 1996).



Şekil 3: Siklin D/cdk4 ve Siklin E/cdk2 komplekslerinin R noktası inhibisyonu (De Vita, 1997)

G1 sürecinin kontrolünden sorumlu moloküller sadece siklin D kompleksinden ibaret değildir. Siklin E G1 evresinde görev alan diğer bir proteindir. Siklin E, siklin D'den sonra G1'in geç döneminde en fazla sentezlenen siklidir (Koff et al. 1992, Dulic et al. 1992). Siklin E'nin uyarımının denetim mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Siklin E cdk2 kompleksi ile kompleks yapar. Siklin E/cdk2 kompleksi siklin D gibi aktif kinazlar ile aktive olur ve G1'in geç döneminde pRb proteinini fosforile ederek S fazına geçişte önemli bir rol oynar (De Vita et al. 1997).

G1 siklinler ve cdk'lar, pRb nin aktivasyonundan dolayısı ile de G1'den S evresine geçişte anahtar rol oynarlar. p107 ve p130 pRb ile ilgili iki substratır. P107 ve p130'un hücre döngüsü sürecindeki rolü E2F transkripsiyon faktörleri ile birlikte şekil 4'te gösterilmiştir. E2F transkripsiyon faktörleri ailesi E2F1, E2F2, E2F3, E2F4 ve E2F5 olmak üzere beş tanedir. E2F proteinleri, DP1, DP2 ve DP3 (DNA polimeraz) 'ten bir tanesi ile heterodimerik kompleks yaparak aktive olur. E2F/DP heterodimerik kompleksi DNA daki özgül dizilere bağlanır ve transkripsiyon faktörlerini aktive ederek hücrenin G1 den S fazına geçmesini sağlar. Bir protoonkogen olan c-abl geninin ürünü olan c-abl proteini pRb genine kendiliğinden bağlanma özelliğindedir. c-abl proteini de E2F transkripsiyon faktörleri gibi siklin/cdk kompleksinin pRb proteinini aktive etmesi ile salınır. Salınan c-abl proteininin hangi olaylarda görev aldığı bilinmemektedir fakat tirozin kinaz c-abl proteinini aktive ederek G1 S geçişinde görev aldığı sanılmaktadır (De Vita et al. 1997).



Şekil 4: E2F transkripsiyon faktörü ve c-abl'nin pRb nin aktivasyonundaki rolü (De Vita, 1997)

Hücre döngüsünde görev alan diğer bir protein ailesi de cdk inhibitörleridir (Levine et al. 1992). Cdk inhibitörleri tablo 1'de gösterildiği gibi iki gruba ayrılmıştır.

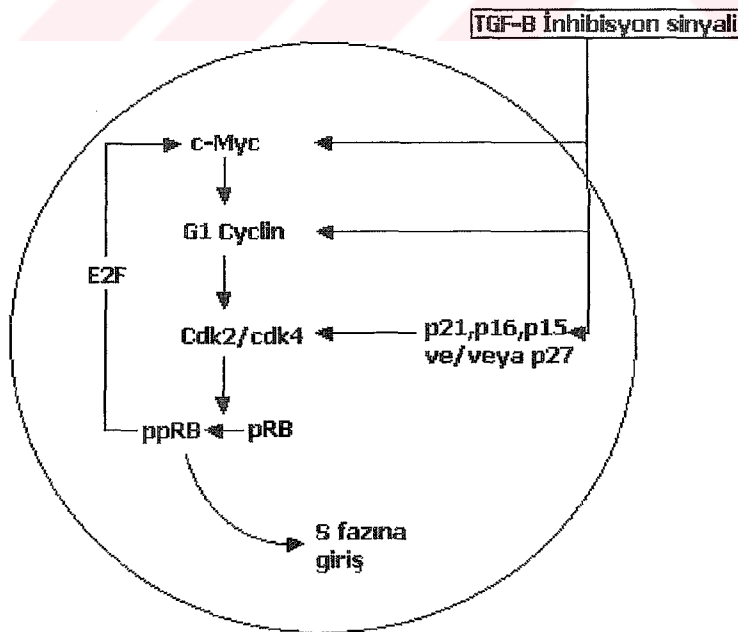
Tablo 1: cdk inhibitörleri

Çeşitli siklin/cdk inhibitörleri	Siklin D/cdk4 ve Siklin D/cdk6 inhibitörleri
P21 ^{WAF1/CIP1}	P16 ^{Ink4}
P27 ^{KIP1}	P15 ^{Ink4B}
P57 ^{KIP2}	P18 ^{Ink4C}
	P19 ^{Ink4D}

Birinci gruptaki cdk inhibitörleri, P21^{WAF1/CIP1}, P27^{KIP1}, P57^{KIP2}, siklin D/cdk4, siklin D/cdk6, siklin E/cdk2 ve Siklin A/cdk2 komplekslerini inhibe eder. Bu inhibitörler CAK tarafından bilinmeyen bir mekanizma ile aktive edilirler (Xiong et al. 1993). Cdk inhibitörlerinin inhibitör sinyal yolunda değişik hücre dışı uyarım yolları da vardır. Örnek olarak DNA hasarında hücre döngüsünün G1 evresinde p53 proteininin miktarını artırarak P21^{WAF1/CIP1} ekspresyonunu artırır (Datto et al. 1995). P21^{WAF1/CIP1} ekspresyonun artması siklin E/cdk2 aktivitesini inhibe eder. P27^{KIP1} G1 fazında TGFβ ile hücre hücre kontakt inhibisyonunu indükler. P57^{KIP2} 'in fizyolojik rolü bilinmemektedir (Xiong et al. 1993).

P21^{WAF1/CIP1} cdk inhibitör ailesinin bir üyesidir ve PCNA'ya (Prolifere edici hücre nükleer antijene) bağlanır. PCNA DNA polimeraz δ enziminin alt birimidir. Bu enzim kompleksi DNA replikasyon ve tamir mekanizmalarında görev alır. Buna rağmen P21^{WAF1/CIP1}'in DNA sentezindeki rolü tam olarak bilinmemektedir (Flores et al. 1994).

İkinci tip cdk inhibitörleri, siklin D/cdk4 ve siklin D/cdk6'yı inhibe eder. Bu gruptaki cdk inhibitörleri, p16^{Ink4}, p15^{Ink4B}, p18^{Ink4C} ve p19^{Ink4D} proteinleridir. TGF β, cdk inhibitörlerinin transkripsiyonunu artırarak siklin D/cdk4 ve siklin D/cdk6 komplekslerini inhibe eder (Şekil 5). Böylelikle Rb proteini transkripsiyon faktöründen (E2F1-5) ayıramaz ve hücre siklusu G1'den S evresine geçişte R noktasında durur (Serrano et al. 1993, Honnon et al. 1994).



Şekil 5: TGFβ inhibisyon sinyal yolları (Alaxandrow, 1995)

2.4. TGF β RESEPTÖRLERİ

TGF β reseptörleri ailesi üç farklı proteinden oluşmaktadır. Bunlar TGF β -RI, TGF β -RII ve TGF β -RIII şeklinde adlandırılmaktadır. Her üç tip reseptör de serin-treonin kinaz aktivitesi gösterir (Wang et al. 1994, Gold et al. 1994, Myeroff et al. 1995, Antar et al. 1995, Lu et al. 1995, Lu et al. 1996, Koli et al. 1997). Tip I ve Tip II reseptörleri heterodimer olarak etki gösterirler. Yapılan çalışmalar, TGF β nın RI ve RII ye kompleks haldeyken bağlanabildiğini, yokluğunda veya protein konformasyonlarının değişikliğinde TGF β nın reseptör kompleksine bağlanamadığını göstermiştir (Wrana et al. 1994, Parsons et al. 1995, Lu et al. 1996). RIII, betaglikan olarak tanımlanmıştır. TGF β nın RIII e tek başına bağlanma özelliği vardır. Bugüne kadar RIII ün hücredeki biyolojik işlevi hala belirlenememiştir. RIII ün aktif TGF β nın salınımında rol aldığı sanılmaktadır (Mackay et al. 1995).

2.4.1. TGF β -RI

TGF β reseptör ailesinin ilk üyesidir. Literatürde "Aktivin A reseptör tip II-like kinaz" diye adlandırılır (Takenoshita et al. 1996). Kromozomal lokalizasyonu 9q33-34.1 arasındadır. Uzunluğu yaklaşık olarak 133.5 Mb dır. Matür proteini 53kD dur (Gene card for TGF β -RI).

2.4.2. TGF β -RII

TGF β reseptör ailesinin ikinci üyesidir. Kromozomal lokalizasyonu 3p22 dir. Matür proteini 70-80kD dur ve 567 amino asitten oluşmuştur (Gene card for TGF β -RII, Serra et al. 1996). Yedi ekson bölgesi içerir. Translasyon başlangıç kodonu (ATG) ve sinyal peptidi kodlayan sekans ekson 1'de , sisteinden zengin ekstraselüler domeini ekson 2 ve ekson 3'de, transmembran domeini ekson 4'de, kinaz katalitik domeini ekson 4'ten ekson 7'ye kadar ve translasyon sonlandırıcı sinyali ekson 7'de kodlanmaktadır (Takenoshita et al. 1996). TGF β -RII ile yapılan çalışmalarda, ekson sekansında mutasyona açık iki ayrı hot spot (mutasyona açık) sekans bulunmaktadır. Bunlardan ilki üçüncü eksonda 125 le 128inci kodonlar arasında bulunan 10 adenin tekrarından oluşan mikrosatellit sekanstır. İkinci hot-spot nokata ise 7inci eksonda bulunan 513-514 ve 532-534 kodonlar arasında bulunan GT tekrarından oluşan mikrosatellit sekanstır (Myeroff et al. 1995, Parsons et al. 1995, Togo et al. 1996).

2.4.3. TGFβ-RIII

TGFβ reseptör ailesinin son üyesidir. Diğer bir adı da betaglikandır (Alexandrow et al. 1995, Koli et al. 1997). Kromozomal lokalizasyonu 1p32-33 arasındadır. Betaglikan olarak da adlandırılır. Matür proteini 300kD dur (Gene card for TGFβ-RIII).

2.5. TEKRARLAYAN DNA DİZİLERİ

İnsan genomik DNA sının tümü transkribe olmaz, aralarında transkripsiyona girmeyen bölgeler (intron diziler) ve tekrarlayan diziler bulunmaktadır. İnsan genomunun yaklaşık olarak %14 ü non allelik tekrarlayan (repatatif) DNA dizilerinden oluşmaktadır (Strachan and Read et al. 1996). Bu tekrarlayan dizilerin bazıları transkripsiyonel olarak inaktifken bazı bölgedeki sekanslar transkripsiyona uğrarlar. Tekrarlayan DNA dizileri genom içinde kabaca iki şekilde karşımıza çıkmaktadır.

a) Genom içinde dağılmış (interspersed) tekrarlayan DNA dizileri

Memeli hücrelerinde, tekrar uzunluğuna göre sınıflandırılmış iki grup interspersed DNA ailesi bulunmaktadır.

i) SINE (Short interspersed nuclear elements)

Ortalama 750.000 gibi yüksek kopya sayısına sahiptirler. Transkribe olan örnekleri bulunmaktadır. En iyi bilinen üyesi primatlara özgü olan Alu ailesidir. Bu sekansın görevi bilinmemektedir (Strachan and Read et al. 1996).

ii) LINE (Long interspersed nuclear elements)

LINE tekrarları L1 elementi olarak anılmaktadır. Kodlanmayan DNA bölgelerinde ya da genlerin gen içi dizilerinde bulunmaktadır. Sadece memelilerde bulunur. Kpn tekrarları en iyi bilinen örneğidir. Genom içindeki görevleri bilinmemektedir (Strachan and Read et al. 1996).

b) Ardarda (tandemly) tekrarlayan DNA dizileri

Genomda kümelenmiş şekilde bulunan DNA sekanslarıdır. Bu grup kendi arasında tekrarlayan bölgelerin uzunluğuna göre satellit, minisatellit ve mikrosatellit DNA olmak üzere üçe ayrılır.

i)Satellit DNA

Boyuant dansite gradient santrifugasyonu ile DNA'nın büyük bir kısmı kalın bir band halinde toplanırken, bu kalın bandın üzerinde üç değişik dansitede ince satellit bandlar tanımlanmıştır. Bu bandlara lokalize olan DNA'nın üç ayrı tandem tekrarlayan dizi sınıfına ait

olduğu saptanmış ve bu sınıflar satellit I, II ve III olarak isimlendirilmiştir (Strachan and Read et al. 1996, Vogel et al. 1997). Bunun dışında bouyant dansite gradient santrifugasyonu ile ayrıştırılmayan başka satellit DNA sınıfları tanımlanmıştır. Bunlardan bir tanesi DNA içeriğinin %3-5ini oluşturan alfa satellit DNA bölgesidir. Alfa satellit DNA, 171 bp'lik tekrar ünitelerinden meydana gelmiş olup, kromozomların sentromerik heterokrometini oluşturmaktadır. Satellit DNA transkripsiyonel olarak inaktif kabul edilmektedir.

ii) Minisatellit DNA

0.1-20kb uzunluğunda kümeler oluşturan DNA dizileridir. Tekrar üniteleri ortak bir kor dizi taşırlar.(GGGCAGGAXG; X herhangi bir nükleotid olabilir.) Mini satellit bölgelerin homolog rekombinasyonlar için hassas bölgeler olduğu düşünülmektedir (Vogel et al. 1997). Pek çok kullanım alanları vardır. Subtelomerik bölgede yığılım göstermeleri linkaj çalışmaları için kullanımlarını sınırlamaktadır. Akrabalık, klonalite çalışmalarında kullanılan "DNA fingerprinting" tekniğinin de bu dizilerden yararlanır (Strachan and Read et al. 1996).

Telomerik DNA'yı oluşturan tekrarlayan diziler bu gruba dahildir. Bu dizi 10-15kb'lık TTA GGG heksonükleotit tekrarlarından oluşur.

iii) Mikrosatellitler

1-6bp'lik basit, ardarda tekrarlar (tandem repeat) şeklindeki dizileri kapsar. En sık mononükleotid ve dinükleotid tekrarlar şeklinde görülürler. Mononükleotid tekrarlar çoğunlukla Adenin (A) ve Timin (T) tekrarlarından oluşmaktadır. (genomun %3'ü) Dinükleotid tekrarlarında CA tekrarı daha sık görülür ve genomun %0.5'ini teşkil eder. CA tekrarlarından sonra CT/AG tekrarı daha sık olarak görülmektedir ve genom boyunca her 50kb da bir gözlenir (genomun %0.2'si). CG/GC tekrarı ise daha nadir gözlenir. Bu durum CpG adalarının metilasyon ve deaminasyona yatkın olmaları nedeni ile evrimsel bir seçim sonucu olduğu düşünülmektedir. Metilasyon ve deaminasyon gibi DNA modifikasyonları, karşı iplikte TpG veya CpA şeklinde mutasyonlara yol açmaktadır (Hearn et al. 1992).

Trinükleotid ve tetranükleotid tekrarları da büyük ölçüde polimorfiktir. Mikrosatellit tekrar bölgeleri, polimorfizm belirlenmesi yolu ile akrabalık testi olarak, heterozigote kaybının saptanması ve genom haritalanması amaçları ile kullanılmaktadır. Mikrosatellit instabilitesi kavramı, açmış olduğu yeni araştırma alanları yanında; desteklediği "mutatör fenotip" hipotezi açısından da büyük önem taşımaktadır.

2.6. MUTATÖR FENOTİP VE KANSER

Dış mutajenik etmenlerden bağımsız olarak meydana gelen mutasyonlara spontan (kendiliğinden) mutasyonlar adı verilir. Bu mutasyonlar endojen kaynaklı biyolojik etmenler tarafından oluşur. Endojen mutasyon kaynaklarının başında, oksijen radikallerinin yol açtığı oksidatif hasar, enzimatik veya non-enzimatik baz metilasyonları, N-glikosil bağının hidrolizi, replikasyon hataları, rekombinasyon hataları ve DNA modifikasyonlarını yetersiz tamiri gelmektedir (Meuth et al. 1996, Miller et al. 1996). Spontan mutasyonlar, evrim sürecini etkileyen önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir. Hücrede oksijen radikallerinin verdiği hasarı tamir eden enzimlerin yanında, DNA hasarlarını tamir eden, tamir enzimleri ve verimi yüksek, düşük hata oranına sahip replikasyon enzimleri de bulunmaktadır.

Drosophila gibi basit organizmalarla yapılan araştırmalarda, spontan bir şekilde oluşan mutasyon sonucunda, organizmanın genom boyunca bir çok genetik lokustaki mutasyon oranının artmış olduğu görülmüştür (Meuth et al. 1996). Bu canlılarda oluşan bir genetik değişiklik, tüm genomda sayısız mutasyon oluşumuna ve genel bir genomik instabiliteye neden olmaktadır. Artmış spontan mutasyon hızına sahip bu organizmalara mutator organizmalar bu özelliğe de mutator fenotip adı verilir. Araştırmacılar, mutator fenotipe neden olan genetik değişikliklerin araştırılması sonucunda, gözlenen artmış spontan mutasyon hızının, genomun kopyalama doğruluğunu düzenleyen gen ve mekanizmalarındaki hatalar sonucu oluştuğunu belirlediler (Meuth et al. 1996, Loeb et al. 1994). Bugün, defektif polimeraz enzimleri, defektif tamir ve/veya detoksifikasyon mekanizmaları ve transkripsiyon hatalarının mutator fenotipe yol açtıkları bilinmektedir (Bronner et al. 1994, Papadopoulos et al. 1995, Boyer et al. 1995).

İnsanda spontan somatik mutasyon hızını saptamaya yönelik çalışmalar çoğunlukla hücre ve doku kültürlerinden yararlanılarak yapılmıştır. Birçok araştırmacının diploid fibroblast ve lenfoblast kültürleri üzerinde yaptıkları ölçümler sonucunda insan hücrelerinde spontan mutasyon oranının ortalama 1.4×10^{-10} mutasyon / baz çifti / hücre bölünmesi olduğu belirlenmiştir. Somatik hücrelerdeki spontan mutasyon hızının hesaplanmasından sonra, germ-hattı hücrelerindeki mutasyon hızının 1.2×10^{-10} mutasyon / baz çifti / hücre bölünmesi olduğu belirlenmiştir. Hem germlinal hem de somatik hücrelerde, mutasyon hızlarının birbirlerine çok yakın olması, iki hücre tipinin, endojen mutasyon kaynaklarından aynı derecede etkilendiğini düşündürmektedir (Loeb et al. 1994).

Tümör oluşumu, proto-onkogen ile tümör supressör genlerdeki mutasyon birikimi ile karakterize kompleks bir süreçtir. Tümör oluşumunun, zaman içerisinde mutasyonların birikimini gerektiren çok aşamalı (multistep) bir süreç olduğu ilk olarak 1954 yılında Foulds tarafından ortaya atılmıştır (Loeb et al. 1994). Kolon kanseri oluşum modelleri, bir kolon epitelial hücrelerinin malign bir hücreye dönüşümü için spesifik genlerde ardaşık gelişen sekiz mutasyonun gerekli olduğunu ileri sürmektedir. İnsanın ortalama yaşam süresince, bir hücrenin geçirdiği toplam bölünme üzerinden hesaplandığında spontan mutasyon hızı, bir hücrede oluşabilecek iki veya üç mutasyon için yeterlidir. Proto-onkogen aktivasyonu için dominant etkili tek bir mutasyonun, tümör supressör gen inaktivasyonu için ise iki mutasyonun yeterli olduğu göz önüne alındığında normal spontan mutasyon hızı, potansiyel kanser hücreleri olabilecek mutant hücrelerin oluşması için yeterlidir (Kinzler et al. 1996). Araştırmacılar, düşük mutasyon oranı ile, transformasyon için gerekli minimum mutasyon sayısını karşılaştırdıklarında, tümörögenезin erken evrelerinde oluşan mutator hücrenin gerekliliğini savunmuş; bu mutator hücrenin daha sonra gelişen genomik instabilite ve klonal seçim sonucu kanser hücrelerini oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir (Yee et al. 1994, Wooster et al. 1994).

Bugüne değin onkogenler ve/veya tümör baskılayıcı genlerde, kolorektal kansere özgül, birçok genetik yeniden düzenlenme (rearrangement), mutasyonlar ve kromozomal kayıplar, sitogenetik ve moleküler yöntemlerle tanımlanmışlardır (Thibodeau et al. 1993, Yee et al. 1994, Chen et al. 1996A).

2.6.1. HNPCC VE MUTATÖR FENOTİP

Kolorektal tümörlerde mutator fenotipin ortaya çıkması ilk kez HNPCC'de (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) gösterilmiştir (Bodmer et al. 1994, Marra et al. 1995). Mutator mutasyonlar ve buna bağlı olarak gelişen mutator fenotip; başka mutasyonlara neden olan mutasyon, ya da bu mutasyonu artıran fenotip şeklinde tanımlanabilir (Loeb et al. 1994). Mutator fenotip (RER "Replication Error in positive fenotip") olarak tanımlanan fenotipin gelişmesinde 6 farklı genin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu genler; MSH2, MLH1, PMS1, PMS2, GTBP ve MSH3 dir (Kinzler et al. 1996, Parson et al. 1995, Nicolaides et al. 1994, Meyers et al. 1997). Yapılan analizler, HNPCC hastalarında bu MMR (Mismatch Repair) genlerinden birine ait mutant bir allelin kalıtıldığını, diğer allelin de tümör dokusunda gelişen ikinci bir mutasyon sonucu inaktive olduğunu göstermiştir. Bu MMR

genlerinden sadece dördü; MSH2, MLH1, PMS1 ve PMS2 genleri, HNPCC olguları ile ilişkilendirilmiştir (Papadopoulos et al. 1995, Broner et al. 1994). Bir diğer mutS homologu olan GTBP (G:T binding protein) ve MSH3 genlerinde ise, sadece sporadik olgularda mutasyonlara rastlanılmıştır (Polombo et al. 1995). Yine mikrosatellit instabilitesi gösteren bazı sporadik olgularda, sayılmış olan MMR genlerinin normal olduğu ancak polimeraz delta geninde mutasyon bulunduğu gösterilmiştir (Costa et al. 1995). Yapılan çalışmalar, mikrosatellit instabilitesinin daha çok endodermal kökenli tümörlerde (kolon, endometrium, pankreas, ösefagus vb.) oluştuğunu göstermiştir (Brentnall et al. 1995). Pek çok laboratuardan destekleyici verilerin birikimi sonucu, mikrosatellit instabilitesi mismatch tamir defekti için tanısal bir ölçüt olarak kabul edilmiştir (Meuth et al. 1996).

2.7. MİSMATCH ONARIMI (MMR)

En iyi bilinen MMR kompleksi E coli'de bulunan Mut HLS sistemidir. Metil-direkt onarım mekanizması yeni sentezlenen DNA'daki kısa tekrarlayan dizi bölgelerinde oluşan mutasyonların onarıldığı mutasyonel mekanizmayı tanımlar. Bu bilinen sistemde yeni sentezlenmekte olan DNA'da oluşan mutasyonlar Mut S ile tanınır ve Mut HLS sistemi ile düzeltilir (Mathews et al. 1990). Mayalarda da (*Saccharomyces cerevisiae*) benzeri bir MMR yolağı (pathway) bulunmaktadır ve proteinleri bakteriyel Mut S ve Mut L ile yüksek homoloji göstermektedir. Bakterilerde ve mayalarda bulunan Mut HLS sistemlerinin hasarı durumunda hücrelerin genomlarında yüksek oranda genomik instabilite gözlenmektedir. MMR genlerinde olası mutasyonlar sonucunda genomik tekrar bölgelerinde nükleotid sayısal değişiklikleri bir başka söylemle tekrarlayan bölgelerin nükleotid dizilimlerinde artmalar veya azalmalara (expansions or contractions) rastlanmaktadır (Bodmer et al. 1994).

DNA sentez hataları iki şekilde oluşabilmektedir: kalıp-primer kayması ve yanlış baz eşleşmesi. Tek veya birkaç bazın delesyonu (kayı) ve/veya insersiyonu (eklenmesi) ile sonuçlanan bu kaymalar, çerçeve kayması mutasyonlarına (frameshift) neden olabilmeleri açısından çok önemlidir. Replikasyon sırasındaki bu kaymalar, genellikle sentezlenen ipliğin kendi üzerine katlanması ('loop' oluşumu) sonucu oluşmakta ve özellikle kısa tekrar bölgelerinde sık görülmektedir (Minnick et al. 1996). Eğer "loop" oluşumu kalıp iplikte gerçekleşirse delesyonlara, yeni sentezlenen iplikte gerçekleşirse insersiyonlara neden olmaktadır. HNPCC tümör hücrelerinde görülen mikrosatellit instabilitelerinin bu tür

polimeraz kaymaları sonucu oluşan hataların defektif tamir mekanizmaları nedeni ile düzeltilememesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bugün bilinen üç eksizyon tamir mekanizmasının üçü de, hatalı nükleotid ve DNA katlantılarının (DNA loop) kesilip çıkartılması sonrasında bir yeni sentez basamağı içerirler (Wood et al. 1997). Bu üç eksizyon tamir mekanizması; nükleotid eksizyon tamiri, baz eksizyon tamiri ve yanlış eşleşme (mismatch) tamiri olarak isimlendirilmişlerdir.

Ökaryotlarda altı polimeraz enzimi bulunduğu bilinmektedir. Bunlar sırasıyla α , β , δ , ϵ , ζ ve γ olarak adlandırılmışlardır. Memelilerde polimeraz α , DNA'nın semikonservatif sentezi için gereklidir, tamir süreçlerinde yer almaz. Polimeraz γ , mitokondrial DNA polimerazdır; o da nükleer genomun tamir süreçlerinde görev almaz. Yeni keşfedilen bir polimeraz enzimi olan polimeraz zeta'nın, hasarlı bir kalıbın replikasyonu sırasında, replikasyon çatalının karşısına çıkan hasarlı bölgenin atlanarak (by-pass) sentezin devamını sağlayan bir enzim olduğu düşünülmektedir. Ancak işleyiş mekanizması tam olarak bilinmediğinden enzim ile ilgili araştırmalar sürdürülmektedir. Polimeraz β , δ ve ϵ 'un herbiri, değişik eksizyon tamir mekanizmalarının yeniden sentez aşamalarında görevlidirler (De Vita et al. 1997).

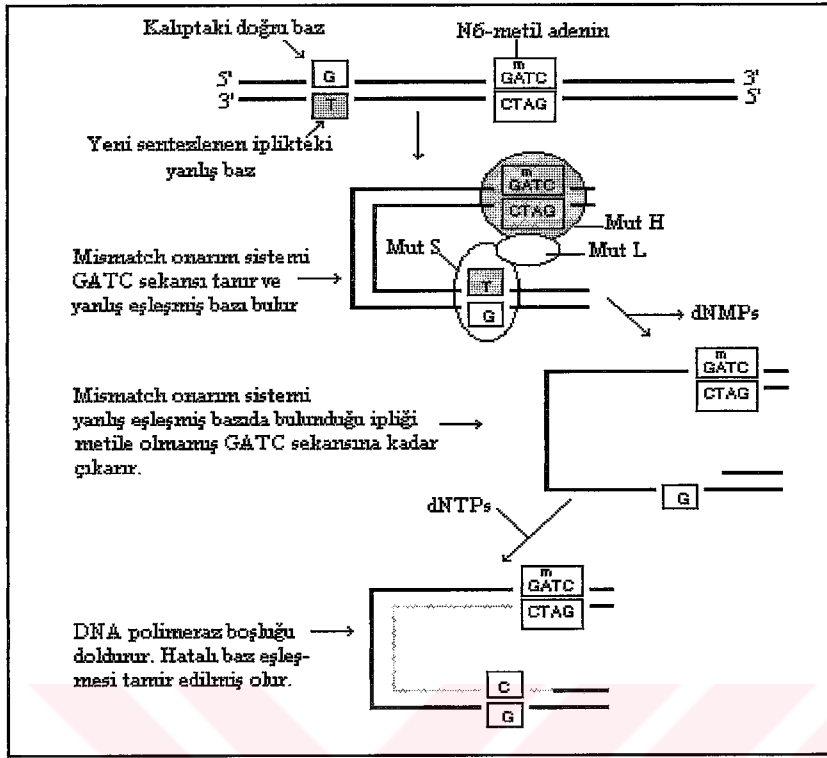
Nükleotid eksizyon tamiri, özellikle DNA'nın helikal yapısını bozan lezyonlarda çalışır, örneğin, UV foto-ürünlerinin ve DNA'da oluşan genişlemiş bülgelelerin (bulky adduct) uzaklaştırılmasından sorumludur. Hasarlı bölgenin kesilip atılmasından sonra resentez için Polimeraz δ ve ϵ 'u kullanır. Nükleotid eksizyon tamir sisteminin çalışması için eksonükleaz ve polimerazlar ile, holoenzim yapısına katılan PCNA (Çoğalan hücre çekirdek antijeni)'nin varlığı gerekmektedir (Shiju et al. 1992).

Baz eksizyon tamiri, spontan hidrolitik depurinasyon, sitozin ve 5-metil sitozinin deaminasyonu, hidroksil serbest radikalleri ile oluşan bazı lezyonlar gibi tek bir bazın DNA ipliğinden çıkartılıp düzeltilmesinden sorumludur. Öncelikle DNA glikozilaz ile hatalı/modifiye bazlar uzaklaştırılmakta ve oluşan 'abazik' bölge bir endonükleaz, polimeraz β ve DNA ligaz enzimi ile tamir edilmektedir. Polimeraz δ ve ϵ 'un da bu sistemde görev aldığı düşünülmektedir (Wood et al. 1997).

Üçüncü eksizyon tamir mekanizması, yanlış eşleşme (mismatch) (MMR=mismatch repair mekanizması) tamiridir. Mismatch tamiri", semikonservatif DNA replikasyonunun kontrolünden kaçan yanlış baz eşleşmelerini replikasyon sonrası tamir eder. E.Coli'de bu sürece katılan genler mutH, mutS, mutL ve mutU (DNA helikaz III) olarak tanımlanmıştır.

MMR sistemi yeni sentezlenmiş ipliği tarayarak, yanlış baz çiftleşmelerini ve baz insersiyon ya da delesyonları sonucu oluşan DNA halkalarını (loop) arar. MutHSL kompleksi yanlış baz çiftleşmesini tanır; mutU'nun da katıldığı enzimatik süreç sonucunda lezyon çıkartılır ve boş kalan bölge tekrar sentezlenir (Şekil 6). E.Coli'de -GATC- adalarındaki adenin nükleotidi genellikle metillenmiş halde bulunur. Replikasyon sonrasında MMR sistemi, yeni sentezlenmiş ipliği, henüz metillenmemiş olmasından tanımaktadır (Mathews et al. 1990). Ökaryotlarda ise mutS ve mutL homologları, yalnız eşleşen bazları ve 14 baza kadar olan DNA halkalarını tanır. Ökaryotlarda bu şekilde saptanan hatalı segmentler henüz tanımlanamayan bir mekanizma ile kesilir ve boş kalan bölge tekrar sentezlenir.

Ökaryotlarda yeni sentezlenen ipliğin nasıl tanındığı henüz kesinlik kazanmamıştır. Ancak burada yine PCNA'nın etkili olduğunu düşündürecek bulgular vardır. İnsan hücrelerinde "mismatch" tamir aktivitesinin, PCNA'ine bağlanan p21^{Cip1} varlığında baskılandığı ve eksojen PCNA ilave edilmesi ile bu baskılanmanın üstesinden gelinebildiği gözlenmiştir (Umar et al. 1996). PCNA ve bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21^{Cip1}'in, insan hücrelerinde mutator fenotipin oluşumuna etkileri araştırılmaktadır. Mutator fenotipe özgü mutasyon birikiminin, mismatch tamir mekanizmasının yeni sentezlenen ipliği tanıyamamasından da kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.



Şekil 6: Mismatch tamir mekanizması (Mathews, 1994)

2.8. MİKROSATELLİT İNSTABİLİTE VE KARSİNOGENEZ

Karsinogenez, somatik mutasyonlar ve klonal genişleme (Clonal expansion) sonucu ortaya çıkan çok aşamalı bir mekanizmadır (Shibata et al. 1996). Kanserde, mutasyona uğrayan pek çok lokus tanımlanmış olmasının rağmen, karsinogenezin temposu hakkında yeterli bilgi edinilememiştir. Tümörün “doubling time” ve yaşının belirlenmesinde mikrosatellit allellerin belirlenmesi yolu ile moleküler yaklaşım yöntemi geliştirilmiştir (Shibata et al. 1996). Her ne kadar mikrosatellit instabilitesi ile belirlenen mutator fenotipin kanserin nedenlerinden biri olduğu anlaşılıyorsa da germ-hattı mismatch tamir defekti olup kanser geliştirmeyen bireylere rastlanmaktadır (Brentnall et al. 1995).

Evrimsel süreçte, replikasyon mekanizmasının hatalarına karşı insan genomu çeşitli avantajlar geliştirmiştir. Bunlardan biri insan genomunun diploid olmasıdır. İnsan genomundaki herhangi bir gende oluşan bir mutasyondan organizma ikinci allelin verdiği normal ürün ile korunabilmektedir. Bir diğer etmen, genomun küçük bir kısmının transkribe olmasıdır. Böylelikle oluşabilecek mutasyonların protein kodlayan sekanslara rastlama olasılığı azalmaktadır. Kodon gevşekliği de bir diğer avantajdır. Herhangi bir gende mutasyon

meydana gelse bile kodlanan aminoasit değişmeme olasılığı bulunabilir. Ancak genomda tüm bu koruma önlemlerinden kaçabilecek bir mutasyon çeşidi bulunmaktadır. Genelde en şiddetli fenotipik etki gösteren mutasyonlar frameshift (çerçeve kayması) mutasyonlarıdır. Çerçeve kayması mutasyonu, mutasyon olan yerden aşağı (downstream) bulunan dizilerdeki tüm üçlü kodon dizilerini değiştirmektedir. Değişim çerçeve kayması olan gen bölgesinin sonuna kadar devam eder. Bu tür mutasyonlar genelde küçük nükleotid tekrarlarının bulunduğu bölgelerde oluşmaktadır. Bu bölgelerde polimeraz kayması (slippage) sonucu bazlarda delesyon veya insersiyonlar oluşmaktadır (Kunkel et al. 1993, Myeroff et al. 1995). Bu bölgeler genelde, kodlanan dizilerin dışında kalsalar da bazı ekson ve promotör sekanslarda bulunan az sayıdaki nükleotid tekrar bölgeleri, genden kodlanan gen ürünlerini bozmaya yetmektedir. Bu tür mutasyonlara karşı genomu koruyan en önemli sistem 'mismatch' tamir mekanizmasıdır (MMR). Sonuç olarak MMR sistemindeki bir defekt, özellikle bu kısa tekrarlayan motiflerde uzama ve kısalmalara neden olacaktır.

Çalışmalarda çeşitli genler içinde bulunan bu tip kısa tekrarlayan dizilerden bahsedilmiştir. Bunlardan ikisi TGFβ-RII geninin 3.eksonundaki 10 adeninlik mikrosatellit bölgesi ve Dystrophin geni içindeki 40 adeninlik mikrosatellit bölgesidir (Parsons et al. 1995).

Yapılan çalışmalar sonucu, günümüzde insan tümörlerinin ortalama %20'sinin RER+ olduğu düşünülmektedir. Çoğu araştırmacı, yaptıkları yorumlarda, RER+ tümörlerin MMR genlerindeki mutasyonların, neoplastik sürecin erken safhalarında oluştuğu, ancak bu mutasyonların kanser oluşumu için tek başlarına yeterli olmadıkları görüşünde birleşmektedirler. MMR genlerinin hücre proliferasyon ve ölümünde direkt etkili olduğunu gösteren hiçbir bulgu bulunmamaktadır (Wind et al. 1995, Baker et al. 1995). RER+'liğin kanser oluşumundaki birincil süreç olmadığı ancak kanserogenezi hızlandırdığı düşünülmektedir (Jiricny et al. 1996).

2.8.1. MİKROSATELLİT İNSTABİLİTESİ VE TGFβ-RII

Geçen on yıl içinde insan kanserlerinin moleküler mekanizmaları anlaşılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalar, moleküler biyoloji tekniklerini geliştirmiş ve bu sahada yeni yöntemlerin bulunması ile ilerlemeler kaydetmiştir. Araştırmacılar, hücrede büyümeyi kontrol eden veya farklılaşmadan sorumlu genlerin etkilenmesi halinde, tümöregeniz sürecinin başladığını göstermişlerdir. Hücre bölünmesini ve farklılaşmasını kontrol eden genlerden biri

de TGF β -RII genidir (Levine et al. 1992, Wrana et al. 1994, Clark et al. 1996, De Vita et al. 1997).

TGF β ailesi aralarında yüksek homoloji gösteren üç homolog peptidten oluşmuştur. Bu peptidler, epitelyal dokularda büyümeyi inhibe eder. TGF β kolon epiteli gibi bazı dokularda apoptotik hücre ölümünü indükler (Wang et al. 1995). TGF β 'nın hücre sinyal iletilisinde görev alan TGF β -RII geninin mutasyonlarında bazı kolon kanserlerinde rastlanmaktadır. Bu tip kolon kanserlerinde TGF β -RII'nin tümör supresör gen olma ihtimalini aklımıza getirebilir (Serra et al. 1996). TGF β -RII geni mutasyonu yüzünden TGF β 'nın işlev görmediği bazı tümör hücrelerinde RII geninin gen terapisi ile işlevi tamir edildiği durumlarda, epitelyal dokunun normal biyolojik fonksiyonlarına döndüğü gösterilmiştir (Gold et al. 1997). TGF β -RII mutasyonları epitelyal dokuda ve özellikle kolon kanserlerinde p53, K-ras, APC, DCC, DPC4 ve mismatch tamir genleri (MSH2, MLH1, PMS1, PMS2, GTBP) ile birlikte görülür. TGF β -RII mutasyonları, %90 oranında RER+ olan kolon kanserleri ve subgurublarında görülmektedir (Shibata et al. 1994, Datto et al. 1995, Lu et al. 1996).

RER+ kolon kanserlerinde görülen TGF β -RII inaktivasyonun moleküler temeli, TGF β -RII geninin üçüncü eksonundaki 709-718 kodonlardaki on bazlık poliadenin sekansı gösterilmiştir (Parsons et al. 1995). RER+ kolon kanserlerindeki TGF β -RII geni inaktivasyonları karakteristik olarak bu bölgeye bir baz eklenmesi veya eksilmesi veya iki baz eklenmesi veya eksilmesi şeklinde karakterizedir. Bu çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları TGF β -RII proteinin transmembran ve intraselüler bölgelerinin güdük (truncated) sentezlenmelerine neden olur. TGF β -RII'nin poli adenin sekansındaki -1 delesyonu 116. aminoasit, -2 delesyonu 129. aminoasit ve +1 insersiyonu 130. aminoasitte proteinin sonlanmasına neden olur (Myeroff et al. 1995). Aminoasit sekansı değişen bu güdük proteinlerin protein konformasyonları da değişmektedir. Üç boyutlu yapısı değişen TGF β -RII proteini TGF β proteinini bağlayamaz ve hücre döngüsünde G1 den S evresine geçişinde inhibisyon için gerekli olan sinyal oluşmaz. Hücre döngüsünün kontrolü bozulan hücreler hızla proliferasyon olarak kanserleşme sürecini başlatırlar (Myeroff et al. 1995, Parsons et al. 1995)..

2.9. KOLON KANSERLERİ VE TGF β -RII MİKROSATELLİT İNSTABİLİTESİ

1970'lerde yapılan çalışmalarda, düşük lifli gıdalarla ve yüksek et diyeti ile beslenenlerde, intestinal bakterilerin metabolik ürünleri ile birlikte kolorektal kanserlerin ortaya çıktığı yayınlanmıştır. Çalışmalarda, diyet ve çeşitli çevresel faktörlerin yanına herediter faktörlerin de katılması ile kolorektal kanserlerin ortaya çıktığı saptanmıştır. 1985 te A. G. Knudson "kansere fenotipinin ortaya çıkması için gen kopyalarının ikisinin de defektif olması gerekliliği" hipotezini ortaya atmıştır. Bu araştırma, kanserde moleküler temellerde yapılan ilk çalışmalardan biridir. Rick Fishel ve Richard Kolodner insan MMR genlerini bulduktan sonra mayada defektif MMR genlerinin bulunması ve mikrosatellit instabilitesinin tanımlanması kolorektal kanser sürecinde büyük ilerlemeler kaydedilmesine yardımcı olmuştur. 1992 yılında Perucho ve arkadaşları, genomik finger printing yaklaşımından yararlanarak AP-PCR (Arbitrary primed PCR) ile kolorektal tümörlerde kantitatif genetik değişiklikleri incelemişlerdir. USM (Ubiquitous somatic mutations) olarak tanımladıkları bu mutasyonların genom boyunca yayılmış Alu tekrarlarının poli-A dizileri içinde birkaç nükleotidin delesyonu sonucu olduğunu gördüler. 1993'de Lindblom ve arkadaşları HNPCC genini 3p23-21 bölgesinde klonlamışlardır. Aynı yıl içinde Fishel ve Jefferson HNPCC'nin MSH2 genindeki defekten ortaya çıktığını saptadılar. Bu çalışmaların ardından MMR kompleksinde yer alan tamir genleri tek tek tanımlanarak sitogenetik lokalizasyonları belirlenmiştir. Kolon kanserleri ile yapılan çalışmalarda defektif MMR geni içeren tümörlerde genom içindeki tekrarlayan bölgelerde mutasyonlar saptanmıştır (Bodmer et al. 1994, Marra et al. 1995, Kinzler et al. 1996).

1993'ün başlarında Thibodeau ve arkadaşları, kolon kanserlerinde proksimal kolona lokalizasyon ve hastanın yaşam süresinin artışıyla mikrosatellit instabilitesi arasında pozitif korelasyon saptadılar. Ayrıca 5q, 17p ve 18q kromozomlarında saptanan LOH ile de ters bir korelasyon olduğunu buldular. Bu grup, HNPCC tümörlerin proksimal kolonda predominant olarak bulunduğunu gösterdiler ancak MIN ve HNPCC arasında bir ilişki olduğunu kanıtlamadılar (Thibodeau et al 1993).

TGF β -RII ile mikrosatellit instabilitesi ile ilgili ilk çalışma 1995 yılında Sandford Markowitz ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada 38 insan kolon tümör hücre hattı ile çalışılmış bu hücre hatlarından 9 hücre hattı grubunda RER+'liği saptanmıştır. RER+ olan bu 9 olguyu 5'inde TGF β -RII geninde instabilite saptanmıştır (Markowitz et al. 1995). Bu çalışmadan sonra Myeroff ve arkadaşları, 29 gastrik kanser olgusunun 7 tanesinde

RER+’liği saptamışlar, bu 7 olgunun 5 tanesinde TGFβ-RII mikrosatellit instabilitesini pozitif olarak bulmuşlardır (Myeroff et al. 1995). Bunun ardından Parson ve arkadaşları 111 RER+’liği saptanan kolorektal kanser olgusunun 100’ünde TGFβ-RII mikrosatellit instabilitesini saptamışlardır (Parson et al. 1995).

Bu çalışmalardan sonra birçok araştırmacı kolorektal kanserlerde TGFβ-RII mikrosatellit instabilitesi korolasyonu araştırmışlar ve kolorektal kanserlerde TGFβ-RII instabilitesi varlığını RER+ olgularda %90-70 arasında bulmuşlardır.



3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GENEL BİLGİ

3.2. ÖRNEKLER

3.3. YÖNTEMLER

3.3.1. DNA İZOLASYONLARI

3.3.1.1. DOKUDAN DNA İZOLASYONU

3.3.1.2. PARAFİN BLOK KESİTLERİNDEN DNA İZOLASYONU

3.3.2. DNA ELEKTROFOREZİ

3.3.3. PCR REAKSIYONLARI

3.4. DENATÜRAN POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ

3.4.1. CAM LEVHALARIN HAZIRLIĞI

3.4.2. JELİN HAZIRLIĞI

3.4.3. JELİN CAM LEVHAYA DÖKÜLMESİ

3.4.4. ELEKTROFOREZ SİSTEMİNİN HAZIRLANIŞI VE ÖRNEKLERİN DENATÜRASYONU

3.5. GÜMÜŞ BOYAMA

3.6. FOTOĞRAFLAMA

3.7. SOLÜSYONLAR

3.8. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE GEREÇLER

3.8.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

3.8.2. KULLANILAN GEREÇLER

3.1. GENEL BİLGİ

Epitelyal tümörlerde Transforming growth faktör beta reseptör II geni mikrosatelit instabilite saptamaya yönelik yaptığımız çalışmada 15 kolorektal ve 26 bilateral meme dokusu çalışıldı. Patoloji anabilim dalı arşivinden bu hastaların tümör ve normal parafin dokuları tarandı. Bu dokular patolojik olarak değerlendirilerek tümör ve normal oldukları doğrulandı. Elde edilen materyalden DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA'lar TGF β -RII (Transforming growth

faktör beta reseptör II) geni üçüncü eksondaki mikrosatelit bölgeye özgül primer seti ile PCR reaksiyonuna tabi tutuldu. PCR reaksiyonu sonuçları 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren %2 lik agoroz jelde Phix174 HaeIII kesim markeri ile yürütülerek 73 bp'lik amplifikasyon doğrulandı. Örnekler 1:1 oranında denatürasyon tamponu ile karıştırılarak 95°C de 5 dak ısı denatürasyonu yapıldı. Isı denatürasyonundan sonra buz üzerine alınan örnekler %8 lik poliakrilamid, 8M üreli jelde yürütüldü. Poliakrilamid jel gümüş boyama yöntemi ile boyandı. Boyanan jel, kontakt baskı ile fotoğraflandı.

3.2. ÖRNEKLER

Bu çalışmada, 15 tane taze kolorektal karsinoma ve 26 tane parafine gömülü bilateral meme tümörü rezeksiyon metaryelinden alınan örnekler kullanıldı. Makroskopik inceleme ile tümör özelliği gösteren alanların nekrotik olmayan bölgelerinden ve normal görünümdeki mukoza alanlarından kolorektal tümöral örnekler (yaklaşık 0.5 cm çapta) alındı. Parafin örneklerinden ve bu örnek alanlarına komşu dokulardan rutin histopatolojik inceleme ile alınan dokuların normal ve tümöral sınırları Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı labrotuvarlarında saptandı. Bilateral meme dokusu parafin örnekleri, mikrotom bıçağı ile alınan 7µm lik kesitler, steril ependorf tüplerine aktarıldı. Alınan parafin örneklerinde, tümör ve normal dokuların birbirine karışmaması için tek kullanımlık mikrotom bıçağı kullanıldı.

3.3. YÖNTEMLER

3.3.1. DNA İZOLASYONLARI

3.3.1.1. DOKUDAN DNA İZOLASYONU

- Doku parçalanıp PBS içerisinde iyice homojenize edildikten sonra, 2500g de 15 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı faz atıldı. Bu aşamada hücre peleti -20°C de saklanabilir.
- Hücre peleti üzerine 4.5ml 1xSTE solüsyonu eklenerek karıştırıcıda karıştırıldı. Üzerine, son konsantrasyonu 100µg/ml olacak şekilde proteinaz K ve %1 lik SDS eklenerek vortekslendi.
- 37°C de gece boyu (~16 saat) veya 55°C de 3 saat bekletildi.
- Örnekler proteinaz K denatürasyonu için kaynar suda 5 dakika bekletildi.
- Tüp üzerine eşit hacimde doymuş fenol eklenerek karıştırıldı.

- Karışım 500g de 10 dakika santrifüj edilerek sıvı faz yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı.
- Üzerine eşit hacimde fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) eklenip sıvı faz yeni bir ependorf tüpe aktarıldı.
- Alınan sıvı faz üzerine, hacminin 1/10 u kadar 3M sodyum asetat (pH:5) ve 2.5 hacimde absöü etanol eklendi DNA (ağımsı yapıda) görünür hale gelinceye kadar tüp yavaş yavaş alt üst edildi. Pastör pipeti yardımı ile DNA yeni bir tüpe aktarıldı veya 10 dakika 13000g de santrifüj eklenerek pelet oluşturuldu, sıvı faz atıldı.
- DNA üzerine %70 lik etanol eklenip santrifüj edildi. DNA oda sıcaklığında 1-2 saat kurutulduktan sonra 200-400 µl TE veya steril saf suda çözüldü. DNA'nın tamamen çözümesi için 37°C etüvde birkaç saat bekletildi. İyice çözünen örnekler -20°C de saklandı.

İzolasyonları gerçekleştirilen kolorektal örneklerin, DNA saflıkları ve miktarları spektrofotometrik ölçümler sonunda hesaplandı.

$$\text{DNA saflık ölçümü : } \frac{260 \text{ nm}'de \text{ ölçülen Optik dansite}}{280 \text{ nm}'de \text{ ölçülen optik dansite}}$$

$$\text{DNA miktarı: Dilüsyon faktörü X Dilüsyon katsayısı X 260 nm OD}$$

3.3.1.2. PARAFİN BLOK KESİTLERİNDEN DNA İZOLASYONU

- Parafin blok kesitlerinden alınan örnekler ependorf tüpüne aktarıldı.
- Ependorf tüplerine 1ml ksilol eklenerek 30 dakika bekletildi.
- Ependorf tüpleri üçer dakika %99 luk, %95 lik ve %70 lik etanol serilerinden geçirilerek örnekler parafinden ayrıldı.
- Tüpler üzerine 100µl Lizis tamponu ve %1 lik SDS eklenerek karıştırıldı. Karıştırılan örneklerin üzerine 500µg/ml olacak şekilde proteinaz K eklendi.
- 58 °C de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- Örnekler proteinaz K inaktivasyonu için 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi.
- Üzerine eşit miktarda +4°C de fenol/kloroform eklenerek karıştırıldı.

- Karışım 13000g de 10 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı faz temiz bir tüpe aktarıldı
- Üzerine toplanan sıvı ile eşit miktarda fenol kloroform izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi eklendi Tüpler 10 dakika 13000g de santrifüj edilerek üst sıvı faz yen bir ependorf tüpüne aktarıldı.
- Örnekler üzerine %99 luk etanol eklenip santrifüj edilerek alkol uzaklaştırıldı. DNA oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Daha sonra üzerine 50µl 0.2xTE tamponu veya steril saf su eklenerek 37°C de DNA'nın iyice çözünmesi sağlandı. Çözünen DNA örnekleri -20°C de saklandı.

3.3.2. DNA ELEKTROFOREZİ

Kolorektal doku örneklerinden elde edilen DNA miktarları spektrofotometrik okuma sonrası hesaplandı. İzole edilen DNA örnekleri %1'lik 0.5µg/ml etidyum bromidli jelde 10 V/cm olacak şekilde 1 saat 0.5xTBE tamponunda yürütüldü. Örneklerin jele yüklenmesi 4µl örnek ve 2µl yükleme tamponu şeklinde yapıldı. İzole DNA ların kaliteleri jelde değerlendirildi. Parafin dokudan elde edilen DNA örnekleri Spektrofotometrik olarak ölçülmedi. İzolasyonu yapılan bu örnekler arşiv materyali olduğundan, elde edilen DNA miktarı azdır. Spektrofotmetrik ölçüm için gerekli olan DNA miktarının harcanması durumunda izole edilen örneklerin büyük bir kısmı kaybedileceğinden ölçüm yapılmadı. Bu örnekler agoroz jelde yürütülerek miktar ölçümleri gözle değerlendirildi.

3.3.3. PCR REAKSİYONLARI

Çalışmada, yukarıda bahsedildiği şekilde izolasyonu ve kalite belirlemesi yapılan DNA lar belirlenen primer seti kullanılarak PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltıldı. PCR da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları Tablo 2'de verilmiştir. PCR ı yapılan ürünler 0.5xTBE tamponu içinde %2 lik 0.5µg/ml etidyum bromidli jelde 10 V/cm olacak şekilde 35 dakika yürütüldü. PCR ürünlerinin büyüklüğü PhiX174 HaeIII kesim molkülükler ağırlık markeri kullanılarak doğrulandı.

Tablo 2: PCR'da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları

Kullanılan maddeler	25 µl	Sonkonsantrasyon
dH ₂ O	16.5 µl	Tamamlayacak kadar
10XTampon	2.5 µl	1 x
dNTP karışımı	0.5 µl	100 µM
MgCl ₂	2 µl	2 mM
Primer 5' sens	0.5 µl	50 pmol
Primer 3' antisens	0.5 µl	50 pmol
Kalıp DNA	2 µl	50-100 ng
Taq polimeraz	0.5 µl	2.5 Ünite

TGF BETA RII Marker bölgesinin amplifikasyonları

Primerler:

Sens (F) : 5'-CTT TAT TCT GGA AGA TGC TGC-3'

Antisens (R) : 5'-GAA GAA AGT CTC ACC AGG C-3'

Sıcaklık profili:

5 dakika 94 °C	İlk denatürasyon
45 saniye 94 °C	
30 saniye 56 °C	33 döngü
45 saniye 72 °C	
5 dakika 72 °C	Son uzama

3.4. DENATÜRAN POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ

3.4.1. CAM LEVHALARIN HAZIRLIĞI

Jel 29x22x0.04cm boyutlarında cam levhaya döküldü. Elektroforez için kullanılacak olan camlar detarjan ve fırça yardımı ile iyice temizlendi. Camlar bol miktarda su ile yıkanarak detarjan

uzaklaştırıldı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan camlar %70 lik etil alkol ile silindi. Camlar, jelin cama yapışmasını önlemek için, 1ml izoproponol ile iyice temizlendi.

İki cam arasına 0.04cm genişliğinde/kalınlığında spacer (aralığı) konuldu. Camlar kısıkaçlar yardımı ile birbiri üzerine kapatılarak sıkıştırıldı.

3.4.2. JELİN HAZIRLIĞI

Mikrosatellit analizi için %8 lik 39:1 kroslink oranında (Akrilamid/N,N'-metilen-bis-akrilamid) 8M üre içeren poliakrilamid jel kullanıldı.

35ml %8'luk 8M üreli jel için;

14.7g üre, 0.7g N,N'- metilen-bisakrilamid, 2.73g Akrilamid tartıldı.

Tartılan kimyasallar 35 ml ye 0.5xTBE tamponu ile tamamlandı. Bir beher içine sıcak su konularak karışım sıcak su içinde manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Çözünen kimyasallar, 0.45µ por çaplı filtreden geçirildi.

3.4.3. JELİN CAM LEVHAYA DÖKÜLMESİ

Filtre edilen camın üzerine 36µl TEMED ve 200µl taze hazırlanmış %10 luk amonyum persülfat eklendi. Jel hemen enjektöre çekildi. Cam 45 derece açı ile tutularak jel iki cam arasına döküldü. Jel donmadan uç kısmına tarak, ters olarak yerleştirildi. Jelin polimerizasyonu için enaz iki saat beklendi.

3.4.4. ELEKTROFOREZ SİSTEMİNİN HAZIRLANIŞI VE ÖRNEKLERİN DENATÜRASYONU

Yükleme öncesinde ters olarak takılan tarak çıkarıldı. Kuyuların oluşturulacağı yüzey 0.5xTBE tamponu ile iyice temizlendi. Üçgen dişli tarak ile kuyular oluşturuldu. Camlar tanka vertikal olarak yerleştirildi. Örnekler Jele yüklenmeden önce, 25W da 30 dakika ön yürütme yapıldı. Böylece jelin ısınması sağlanmış oldu. Örnekler, denatüran yükleme tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldı ve 95°C de 5 dakika denatüre edildi. Denatüre olan örnekler hemen buz üzerine alındı.

Her örneğin tümör ve normal DNA'ları yanyana gelecek şekilde, her kuyuya 2µl örnek yüklendi. Jel kuyulara yüklenmeden önce kuyular 1ml lik otomatik pipet yardımı ile tekrar yıkandı.

Elektroforez 25W sabit akımda 0.5xTBE tamponu ile 100 dakika yürütüldü.

3.5. GÜMÜŞ BOYAMA

Elektroforez sonunda iki cam levha bistüri yardımı ile birbirinden ayrıldı. Düz cam üzerindeki jelin gümüş nitrat ile boyanması modifiye Bassam yöntemi kullanılarak aşağıda belirtilen kimyasallar ile gerçekleştirildi (Kim et al. 1995).

Tablo 3 : Gümüş boyama prosedürü.

Basamaklar	Solüsyon konsantrasyonları	Uygulama süreleri
Fiksasyon	%10 metanol, %5 Glasiel asetikasit	45 dakika
Yıkama	%10 Etanol	5 dakika
HNO ₃	%1 HNO ₃	2 dakika
Gümüş	0.012M AgNO ₃ , 300 µl formaldehit	20 dakika
Yıkama	ddH ₂ O	30 saniye
Developer	0.28M Na ₂ CO ₃	10 dakika
Durdurma	ddH ₂ O	1 dakika

3.6. FOTOĞRAFLAMA

Poliakrilamid jel transparan asetat üzerine alındı. Üstten ışıklandırma ile, altına Ilford no:2 fotoğraf kartı yerleştirilerek pozlandı. (kontakt baskı) Böylelikle, jel bat rezolüsyonları korunarak, birebir baskı sağlanmış oldu.Elde edilen görüntü jel görüntüsünün negatiftir.

3.7. SOLÜSYONLAR

- **TET (Tris-EDTA-Tween 20) çözeltisi**
 - 50 mmol TrisHCl (pH 8.5)
 - 1 mmol EDTA
 - %0.5 Tween 20
- **Proteinaz K (Promega Kat.No: V 3021)**
 - 20 mg/ml olacak şekilde dH₂O ile sulandırıldı.
- **1X STE (Sodyum,Tris,EDTA) çözeltisi**
 - Tris HCl 10.0 mM (pH 8.0)
 - NaCl 100 mM
 - Disodyum EDTA 1.0 mM
- **Fenol (Sigma Kat. No: P 4547)**
 - Fenol fazının pH'ının 7.9 ±0.2 olması için, birlikte sağlanan dengeleyici tampon ile karıştırıldı.
- **Fenol:Kloroform:İzoamil alkol**
 - 25 ml fenol (pH 7.9)
 - 24 ml kloroform
 - 1 ml izoamil alkol karıştırılır.
- **3 M Sodyum asetat (pH 5.2)**
 - 408.1gr sodyum asetat (3 sulu) 1 lt d H₂O da çözüldü. pH ı glasiyel asetik asit ile ayarlandı.

- **1XTBE**

10.8 gr Tris baz (0.04 M)
5.5 gr Borik asit
40 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
1 litreye distile su ile tamamlanır.

- **5M EDTA**

186.1 gr Disodyum EDTA (2 sulu)
1 litreye distile su ile tamamlandı.
pH'ı 10 M NaOH ile 8.0'a ayarlandı.
Not: EDTA pH 8.0'da çözülür.

- **Denatüran jel yükleme tamponu**

Son konsantrasyonları;
-% 95 Formamid
-20mM EDTA
-% 0.05 Brom Fenol Blue
-% 0.05 Ksilen Siyanol olacak şekilde karıştırıldı.

- **Agaroz jel için denatüran olmayan yükleme tamponu (6X)**

-% 0.25 bromfenol blue
-% 40 (W/V) sukroz

- **10 X Taq Polimeraz için çalışma tamponu**

-10 mM Tris HCl
-%0.1 Triton X 100
-50 mM KCl
-1.5 mM MgCl₂
-0.2 mg/ml BSA
tampon pH ı 9.0 a ayarlanır.

- **Primerler**

Primerler 0.2µmol konsantrasyonda ve HPLC ile saflaştırılmış olarak alındı. Liyofilize halde gelen primerler 100 pmol/µl konsantrasyonda olacak şekilde dH₂O ile çözüldü.

- **0.012 M Gümüş nitrat (AgNO₃) solusyonu:**

0.510 gr AgNO₃ tridistile su ile çözülür. 250 ml ye tamamlanır. Taze hazırlanmalıdır.

- **Fiksatif (%10 metanol ve %5 glasiyel asetik asit):**

25 ml metanol ile 12.5 ml glasiyel asetik asit karıştırılır ve 250 ml ye tridistile H₂O ile tamamlanır. Taze hazırlanmalıdır.

- **0.28 M Na₂CO₃ , %0.045 formamid:**

14.8 gr Na₂CO₃ 500 ml tridistile su ile çözülür. Solusyonun içerisine 300µl %37 lik fomamid (Sigma Kat. No: F 1635) eklenir. Solusyon taze hazırlanmalıdır.

- **Etidyum Bromid (20 mg/ml konsantrasyonda) (Sigma Kat.No: E 7637)**

200mg etidyum bromid çeker ocak içerisinde tartılarak 10 ml dH₂O içerisinde çözüldü. Etidyum bromid karsinojen bir madde olduğundan tartım ve çözülme aşamalarında korunmak amacı ile eldiven ve maske giyilmiştir. Çalışılan çevrenin kontamine edilmemesi için dikkat edilmiştir.

- **Amonyum Persulfat (%10) (Sigma Kat.No: A 9164)**

1 gr. Amonyum persulfat 10 ml ye tridistile H₂O ile tamamlanır.

- **%1 HNO₃ (Merck Kat.No:441)**

% 65'lik stoktan 3,8 ml alınıp 250 ml'ye dH₂O ile tamamlanır.

3.8. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE GEREÇLER

3.8.1. KULLANILAN GEREÇLER

Gereç	Marka
PTC-100 Thermal cycler	M.J. Resarch, INC
Elektroforez ekipmanı	ATTA
Güç kaynağı	Pharmacia Biotech
Santrifüj	Heraeus
Soğutmal santrifüj	Sorvall RMC 14
Su banyosu	Grant
Manyetik karıştırıcı	Nüve
pH metre	Orion
Tartı	Chyo
Spektrofotometre	Pharmacia Biotech
Agrandizör	Lupo
Orbital karıştırıcı	Nüve
Otomatik pipetler	0.2-200 µl Gilson
	20-200 µl Gilson
	100-1000 µl Gilson

3.7.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

- %10 SDS (Sigma Kat. No: L 4542)
- Agaroz (Sigma Kat.No: A 9539)
- Akrilamid (Sigma Kat. No: A-9099)
- Amonyum persülfat (Sigma Kat.No: A 9164)
- Borik Asit (Sigma Kat.No: B 6768)
- Brom fenol blue (Sigma Kat.No: B5525)

- dNTP mix (Appligene Kat. No: 161461) Her dNTP'den 5µmol içeriyor.
- EDTA (Titriplex III) (Merck Kat.No: 1.08421)
- Etanol (Carlo ERBA Kat.No: 414608)
- Etidyum bromid (Sigma Kat.No: E 7637)
- Fenol (Sigma Kat.No: P 4547)
- Formaldehit (Sigma Kat.No: F 1635) (%37)
- Glasiyel asetik asit %37 (Merck Kat.No: 1.00056)
- Gümüş nitrat (Merck Kat.No: 1510)
- İsoamil alkol ((Merck Kat.No:977)
- Kloroform (Sigma Kat.No: C 2432)
- Ksilol (Merck Kat. No: 1.08685)
- Metanol (Merc Kat.No: 1.06008)
- Nitrik asit (Merck Kat. No: 441)
- N,N'-Metilen -bis-akrilamid (Sigma Kat. No: M-2022)
- Proteinaz K (Sigma Kat.No:P2308)
- Sodyum karbonat (Sigma Kat.No: S7795)
- Taq polimeraz (Appligene Kat.No: 120181)
- TEMED (Sigma Kat. No: T 7024)
- Trisma-Base (Sigma Kat. No: T 8524)
- Üre (Sigma Kat. No: U-5378)
- Xylene Ciyanol FF (Sigma Kat.No: X 4124)

4.BULGULAR

4.1.DNA ELEKTROFOREZİ

4.2. PCR AMPLİFİKASYONLARI

4.3. POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ

Epitelyal kanserlerde, TGF β -RII geni Mikrosatellit instabilitesini saptamaya yönelik yaptığımız bu çalışmada 15 kolorektal karsinoma taze (fresh) dokusu ve 26 bilateral meme parafin blok kesitinden izole edilen DNA lar kullanıldı. Mikrosatellit bölgelerde polimorfizm doğal olduğu için, tümörle aynı kişinin normal dokusu karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı.

Bu örneklerin tümör ve normal dokuları ayrı ayrı olmak üzere DNA ları izole edildi. Kolon DNA larının spektrofotometrik olarak saflık değerleri hesaplandı. Bu değerler Tablo 4'te görülmektedir. İzole edilen DNA'lerden TGF β -RII mikrosatellit primer seti ile amplifiye edildi. Amplifikasyon örnekleri agoroz jelde doğrulandıktan sonra %8'lik 8M üreli poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldükten sonra gümüş boyama yapıldı ve fotoğraflanarak değerlendirildi.

Tablo 4 : Kolorektal DNA saflık ve miktarları.

Doku no	Saflık	DNA miktarı
Kolon tümör 1	2.63	55 µg/ml
Kolon normal 1	1.53	65 µg/ml
Kolon tümör 2	1.31	94 µg/ml
Kolon normal 2	1.75	35 µg/ml
Kolon tümör 3	1.43	540 µg/ml
Kolon normal 3	1.46	90 µg/ml
Kolon tümör 4	1.21	240 µg/ml
Kolon normal 4	1.86	410 µg/ml
Kolon tümör 5	1.32	105 µg/ml
Kolon normal 5	1.03	80 µg/ml
Kolon tümör 6	1.96	105 µg/ml
Kolon normal 6	1.32	90 µg/ml
Kolon tümör 7	1.02	1350 µg/ml
Kolon normal 7	1.75	2300 µg/ml
Kolon tümör 8	1.32	1200 µg/ml
Kolon normal 8	1.54	1350 µg/ml
Kolon tümör 9	1.42	950 µg/ml
Kolon normal 9	1.15	1110 µg/ml
Kolon tümör 10	1.23	350 µg/ml
Kolon normal 10	1.58	425 µg/ml
Kolon tümör 11	1.35	1140 µg/ml
Kolon normal 11	1.34	1240 µg/ml
Kolon tümör 12	1.56	355 µg/ml
Kolon normal 12	1.75	520 µg/ml
Kolon tümör 13	1.63	865 µg/ml
Kolon normal 13	1.50	560 µg/ml
Kolon tümör 14	1.89	578 µg/ml
Kolon normal 14	1.64	456 µg/ml

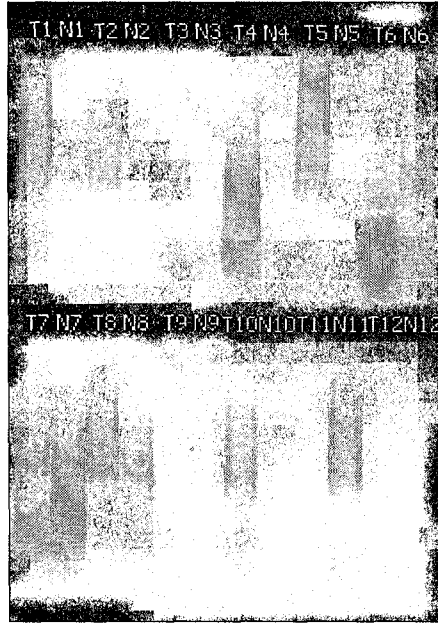
Kolon tümör 15	1.45	350 µg/ml
Kolon normal 15	1.52	540 µg/ml

4.1.DNA ELEKTROFOREZİ

DNA izolasyonları sonunda, PCR amplifikasyonu öncesinde DNA lar %1 lik 0.5µg/ml etidyum bromidli jelde 10 V/cm olacak şekilde 1 saat 0.5xTBE tamponunda yürütüldü. Yürütülen DNA ların intakt olup olmadığına bakıldı. (Resim1,2)



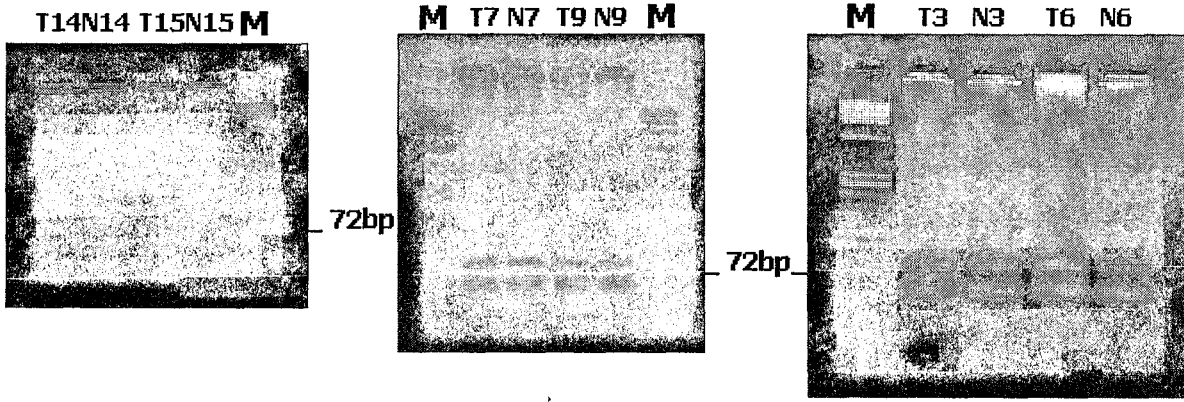
Resim 1 : %1'lik etidyum bromidli agoroz jelde yürütülmüş kolorektal doku DNA ları.



Resim 2 : %1 lik etidyum bromidli agoroz jelde yürütülmüş bilateral meme dokusu DNA ları.

4.2. PCR AMPLİFİKASYONLARI

DNA elektroforezi sonrasında PCR reaksiyonuna geçildi. PCR reaksiyonları 33 döngüde gerçekleştirildi. 73 bp lik TGF β -RII geni amplifikasyon ürünleri, 0.5 μ g/ml etidyum bromidli 0.5xTBE tamponu içinde %2'lik agoroz jelde 10 V/cm olacak şekilde 4 μ l örnek ve 2 μ l yükleme tamponu karıştırılarak 35 dakika yürütüldü. PCR ürünlerinin büyüklüğü PhiX174 HaeIII kesim moleküler ağırlık markeri kullanılarak doğrulandı. (Resim 3)

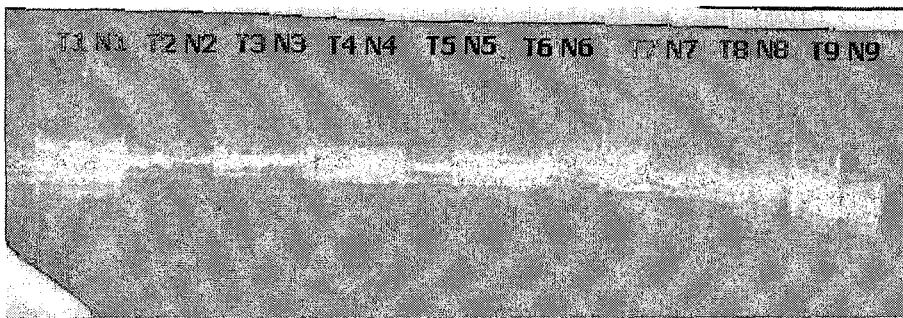


Resim 3 : %2 lik, etidyum bromidli, agoroz jelde 73 bp lik TGF β -RII amplifikasyon örnekleri.

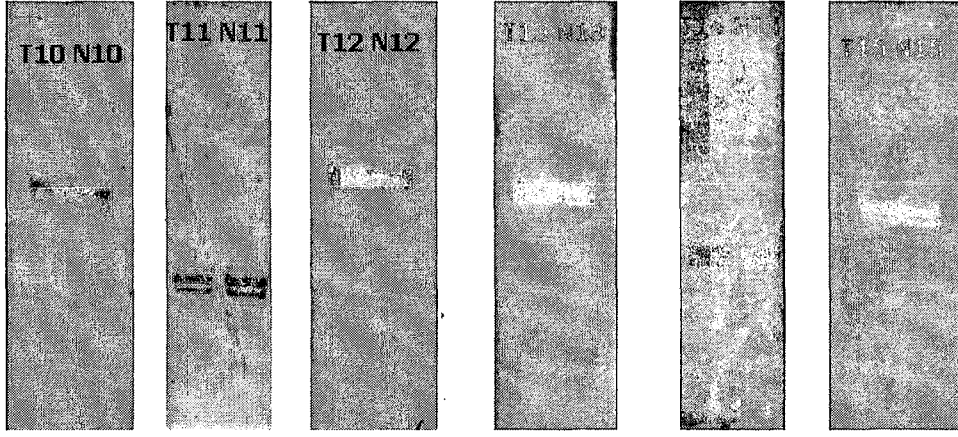
4.3. POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ

Amplifikasyon ürünlerinin 73bp olduğu doğrulandıktan sonra, 1:1 oranında denatüran tampon ile karıştırılarak 95 °C’de 5 dakika denatüre edildi. Denatüre olan örnekler hemen buz üzerine alındı. Bu arada güç kaynağı kapatılarak ön yürütme yapılan jel kuyuları 1ml lik otomatik pipet yardımı ile temizlendi. Bundan sonra örneklerin yüklenmesi işlemine geçildi. Örneklerin yüklenmesi, her hastanın tümör ve normal DNA’ları yanyana olmak üzere her kuyuya 2.5 μ l olacak şekilde yüklendi.

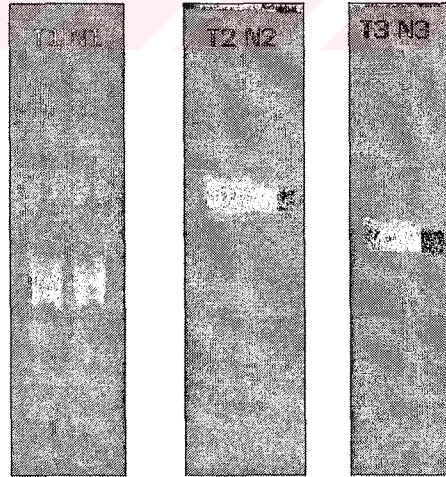
Elektroforez 25W sabit akımda 0.5xTBE tamponu ile 100 dakika yürütüldü. %8 lik poliakrilamid jelde elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, gümüş boyama yöntemi ile boyanarak fotoğraflandı.



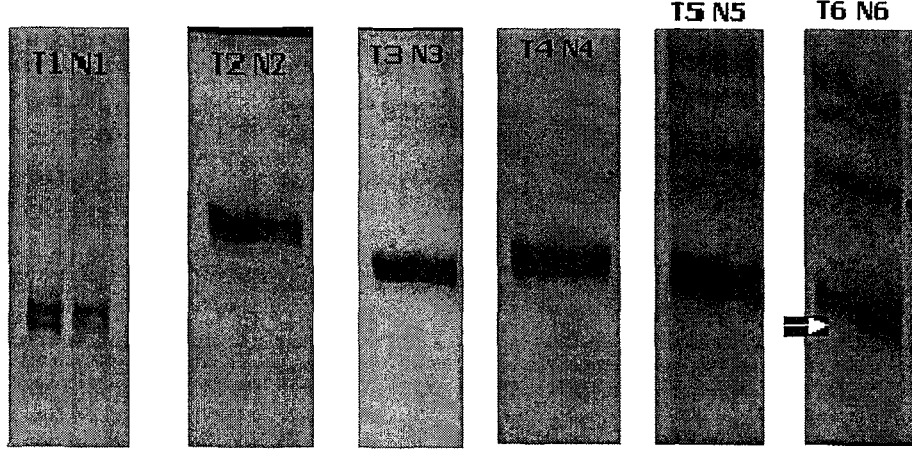
Resim 4 : Dokuz kolorektal tümörde TGF β -RII mikrosatellit markeri ile yapılan analizlerde normal sonuçlar görülmektedir.



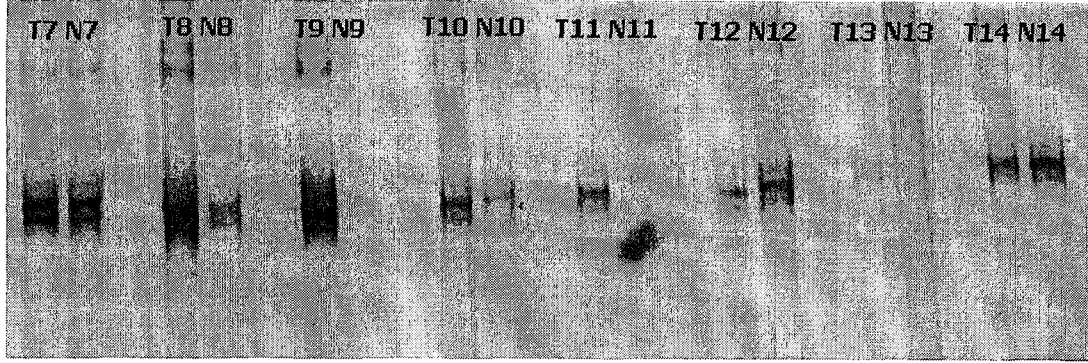
Resim 5 : Altı kolorektal tümörde TGF β -RII mikrosatellit markeri ile yapılan analizlerde normal sonuçlar görülmektedir.



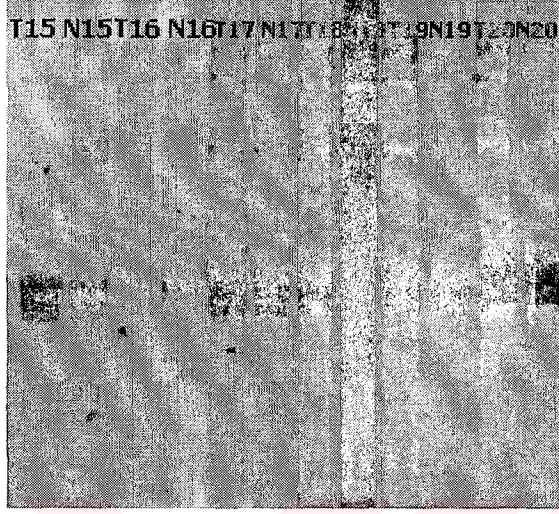
Resim 6 : Üç bilateral meme tümöründe TGF β -RII mikrosatellit markeri ile yapılan analizlerde normal sonuçlar görülmektedir.



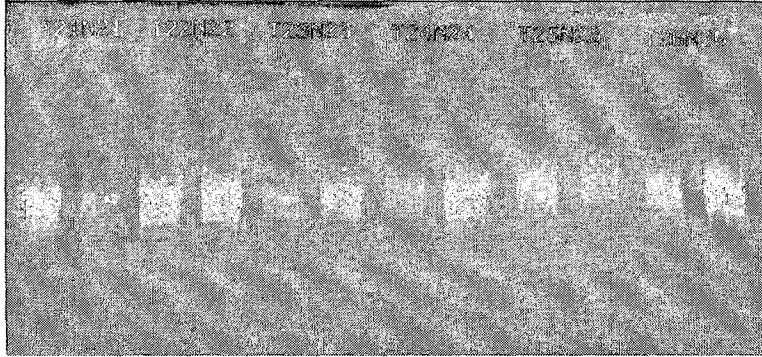
Resim 7 : Altı bilateral meme tümöründe TGF β -RII mikrosatellit markeri ile yapılan analizlerde 6 no.lu olguda instabilite sonucu görülmektedir.



Resim 8 : Sekiz bilateral meme tümöründe TGF β -RII mikrosatellit markeri ile yapılan analizlerde normal sonuçlar görülmektedir.



Resim 9 : Altı bilateral meme tümöründe TGF β -RII mikrosatellit markeri ile yapılan analizlerde normal sonuçlar görülmektedir.



Resim 10 : Altı bilateral meme tümöründe TGF β -RII mikrosatellit markeri ile yapılan analizlerde normal sonuçlar görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Onkogenik mutasyonlar, hücrenin doğal işlevi içerisinde yaşamsal önemi olan yollarda, sinyal iletimi basamaklarında işlev görmekte olan proteinlerin değişimi ve değişimin sonucunda sinyal iletiminde doğal olmayan sinyallerin oluşumuna veya sinyal iletilmesinin işlememesine neden olurlar. Bu değişimler hücre tarafından tolere edilemediği durumlarda spontan hücresel yanıt olarak değişim gözlenir (Alexandrow et al. 1995, Kinzler et al. 1996, Hahn et al. 1996).

Bugüne kadar birçok olguda, DNA “mismatch” onarım mekanizması genlerinde germ hattı mutasyonlar tanımlanmıştır (Wooster et al. 1994, Chen et al. 1996B, Grady et al. 1997). DNA “mismatch” onarım genleri replikasyon sonrasında yeni DNA sentezlenmesi sırasında oluşan yanlış baz eşleşmelerini, tek baz insersiyonlarını, delesyonlarını düzeltmekle sorumlu proteinleri kodlarlar (Mathews et al. 1990, Papadopoulos et al. 1995, Kinzler et al. 1996). DNA da bulunan kısa, düzenli tekrarlayan (STR) mikrosatellit bölgeler, molekülün topolojik konformasyonu gereği, var olan spontan mutasyon oranındaki artışlarla, DNA replikasyonu sırasında bu bölgelerde mutasyonların (yalnış baz eşleşmeleri veya DNA polimerazın kayması sonucu delesyon/insersiyon) oluşumuna, onarım gerçekleştirilemediği koşullarda ise mutasyonların birikimine neden olmaktadır (Shibata et al. 1994, Wooster et al. 1994). Genomik instabilite olarak tanımlanan, genomun tekrarlayan dizi bölgelerinde görülen değişikliklere ilk kez kolorektal kanserlerde rastlanmıştır. Farklı araştırma gruplarınca USM (Ubiquitous somatic mutation), MIN (Microsatellite Instability) ve RER (Replication Errors) olarak tanımlanan genomik değişiklikler genel kullanımı ile mikrosatellit instabilitesi veya genomik instabilite olarak kullanıma yerleşmiştir (Marra et al. 1995). İlk kez kolon ve rektum tümörlerinde görülen bu değişikliklerin, yapılan çalışmalar sonucunda endometrium, gastrik, kolon adenomları ve ailesel kolorektal kanserlerle ilişkisi olmayan mesane, beyin, meme, karaciğer, ovaryum, pankreas, prostat, uterus, gliom, ve özefagus adenokarsinomu gibi

proliferasyonun ortadan kalkmasına ve hücrenin kontrolsüz çoğalmasına neden olmaktadır (Myeroff et al.1995, Parsons et al.1995, Markowitz et al. 1995, Lu et al. 1995, Renault et al. 1996, Akiyama et al. 1997).

TGF β -RII geninin p(A₁₀) bölgesinde oluşan 1 ve 2 adeni baz kayıpları frameshift mutasyonlarına yol açarak güdük (truncated) protein sentezlenmesine neden olur. TGF β -RII'nin poliadenin sekansındaki -1 delesyonu 116. aminoasit, -2 delesyonu 129. aminoasit ve +1 adisyonu 130. aminoasitte proteinin sonlanmasına neden olur (Myeroff et al. 1995). Üç adenin bazı delesyonunda, üçlü kodon şifresi değişmediği için protein güdük olmaz. Fakat bir aminoasit az sentezlendiği için proteinin birbiri üzerine katlanmaları yani konformasyonel (üç boyutlu) yapısı değiştiği için TGF β proteinini bağlayamaz.

Bizim çalışmamızda kullandığımız 15 kolorektal ve 26 bilateral kanser dokusu TGF β -RII geni mikrosatellit instabilite sonuçlarında; 15 kolorektal tümör dokusunda TGF β -RII geninde instabilite saptanamamıştır. Çalışılan 26 bilateral tümör dokusundan birinde TGF β -RII geninde instabilite saptanmıştır. Toplam bakılan 41 epitelyal kanser dokusundan sadece birinde TGF β -RII geni instabilitesi saptanmıştır (%2.39).

Epitelyal kanserlerde TGF β -RII mikrosatellit instabilite çalışması ilk olarak Markowitz ve arkadaşları tarafından 1995 yılında yapılmıştır. Toplam 38 kolon kanser hücre hattı ile yapılan bu çalışmada, RER(+) olan kolon kanser hattı hücrelerinin, TGF β -RII geni ekspresyonuna bakılmıştır. Bu çalışmaya göre, RER(+) olan 11 hücre hattının dokuzunda TGF β -RII ekspresyonu azalmış olarak bulunmuştur. RER(-) olan 27 kolon kanser hücre hattında ise sadece 3 örnekte TGF β -RII ekspresyonu azalmış olarak bulunmuştur. RER(+) kolon hücre hattı ile RER(-) hücre hatlarının karşılaştırılmasında, 27 RER(-) hücre hatının 24'ünde TGF β -RII transkripsiyonunun %90 olduğu ve bu hücrelerde büyümeyi %100 oranında inhibe ettiğini saptamışlardır (Markowitz et al 1995).

Diğer bir çalışmada Antar ve arkadaşları, iki baş boyun kanseri dokusunda, TGF β -RII geninin serin treonin kinaz domeinini kodlayan bölgesinde G:C→C:G transversiyonunu saptamışlardır. Bu transversiyon serin tronin kinaz domeini içinde yüksek derecede korunan

proliferasyonun ortadan kalkmasına ve hücrenin kontrolsüz çoğalmasına neden olmaktadır (Myeroff et al.1995, Parsons et al.1995, Markowitz et al. 1995, Lu et al. 1995, Renault et al. 1996, Akiyama et al. 1997).

TGF β -RII geninin p(A₁₀) bölgesinde oluşan 1 ve 2 adeni baz kayıpları frameshift mutasyonlarına yol açarak güdük (truncated) protein sentezlenmesine neden olur. TGF β -RII'nin poliadenin sekansındaki -1 delesyonu 116. aminoasit, -2 delesyonu 129. aminoasit ve +1 adisyonu 130. aminoasitte proteinin sonlanmasına neden olur (Myeroff et al. 1995). Üç adenin bazı delesyonunda, üçlü kodon şifresi değişmediği için protein güdük olmaz. Fakat bir aminoasit az sentezlendiği için proteinin birbiri üzerine katlanmaları yani konformasyonel (üç boyutlu) yapısı değiştiği için TGF β proteinini bağlayamaz.

Bizim çalışmamızda kullandığımız 15 kolorektal ve 26 bilateral kanser dokusu TGF β -RII geni mikrosatellit instabilite sonuçlarında; 15 kolorektal tümör dokusunda TGF β -RII geninde instabilite saptanamamıştır. Çalışılan 26 bilateral tümör dokusundan birinde TGF β -RII geninde instabilite saptanmıştır. Toplam bakılan 41 epitelyal kanser dokusundan sadece birinde TGF β -RII geni instabilitesi saptanmıştır (%2.39).

Epitelyal kanserlerde TGF β -RII mikrosatellit instabilite çalışması ilk olarak Markowitz ve arkadaşları tarafından 1995 yılında yapılmıştır. Toplam 38 kolon kanser hücre hattı ile yapılan bu çalışmada, RER(+) olan kolon kanser hattı hücrelerinin, TGF β -RII geni ekspresyonuna bakılmıştır. Bu çalışmaya göre, RER(+) olan 11 hücre hattının dokuzunda TGF β -RII ekspresyonu azalmış olarak bulunmuştur. RER(-) olan 27 kolon kanser hücre hattında ise sadece 3 örnekte TGF β -RII ekspresyonu azalmış olarak bulunmuştur. RER(+) kolon hücre hattı ile RER(-) hücre hatlarının karşılaştırılmasında, 27 RER(-) hücre hattının 24'ünde TGF β -RII transkripsiyonunun %90 olduğu ve bu hücrelerde büyümeyi %100 oranında inhibe ettiğini saptamışlardır (Markowitz et al 1995).

Diğer bir çalışmada Antar ve arkadaşları, iki baş boyun kanseri dokusunda, TGF β -RII geninin serin treonin kinaz domeinini kodlayan bölgesinde G:C→C:G transversiyonunu saptamışlardır. Bu transversiyon serin tronin kinaz domeini içinde yüksek derecede korunan

glutamik asitin glutamine ve arjininin proline değişmesine yol açar. Bu durumda TGF β proteini reseptör kompleksine bağlansa bile, TGF β -RI TGF β -RII'yi fosforile edemediği için sinyal iletisi olamaz ve hücre döngüsünün G1 evresinde inhibisyonu ortadan kalkar (Antar et al. 1995).

Lu ve arkadaşları, 38 kolorektal dokusu ile yaptıkları çalışmalarda, p(A₁₀) ve (GT)₃ mikrosatellit marker bölgelerini SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) yöntemi ile taramışlar ve 38 dokunun 24 ünde genomik bir instabilite saptamışlardır. Genomik instabilite saptanan dokunun 24 dokunun 17 sinde (%71) p(A₁₀) mutasyonu bulunmuş (GT)₃ mutasyonu ise saptanmamıştır. p(A₁₀) mutasyonu saptanan dokularda bu bölge için dizi analizi yapıldığında 17 tümörün dokuzunda 10 adeninlik bölgede delesyon saptamışlardır (Lu et al. 1995).

Myeroff ve arkadaşları, mide ve endometrial kanserler ile yaptıkları çalışmada 29 mide tümör dokusunun yedisinde ve 33 endometrial tümörün 24 ünde genomik instabilite saptamışlardır. Genomik instabilite saptanan yedi mide tümör dokusunun altısında ve 24 genomik instabilite saptanan endometrial dokunun beşinde TGF β -RII p(A₁₀) bölgesinde instabilite saptamışlardır (Myeroff, et al. 1995).

Parson ve arkadaşları genomik instabilite sptanmış olan 111 kolorektal tümörü ile yaptıkları çalışmada, 100 tümör dokusunda (%90) TGF β -RII p(A₁₀) bölgesinde instabilite saptamışlardır. Parson ve arkadaşları RER(+) olan tümör dokularının geç dönemde (mutasyon birikimi ile) TGF β -RII p(A₁₀) bölgesinde oluşan mutasyondan dolayı bu hücrelerin proliferasyonu inhibe edici etkisinin ortadan kaybolduğunu ve bu yüzden hücrenin kanserleşme sürecine girdiğini bildirmişlerdir (Parsons et al. 1995).

Renault ve arkadaşlarının 40 primer gastrik karsinoma hücresi ile yaptıkları çalışmada, 8 tane tümör olgusunda TGF β -RII p(A₁₀) bölgesinde mutasyon saptamışlardır. Renault ve arkadaşları kurdukları hipoteze göre; “karsinojenik yolda, selektif olarak RER(+) olan gastrik hücrelerinin, RII mutasyonu ile büyüme ve proliferasyon avantajı sağlaması, hücreyi malin transformasyona sokmakta” şeklinde tanımlanmıştır (Renault et al 1996). Gerçektende çalışmalara bakıldığında mismatch tamir mekanizması bozukluğu ile seyreden HNPCC

olgularında oluşan TGFβ-RII instabilitesinin eklenmesi ile tümöral hücrenin daha agresif bir tavır sağladığı görülmektedir.

Ohue ve arkadaşlarının 43 gastrik tümör üzerinde yaptığı çalışmada 3 tümör için TGFβ-RII p(A₁₀) bölgesinde mutasyon saptamışlardır. Ohu ve arkadaşları, aldıkları histolojik kesitleri patolojik olarak iyi, orta ve kötü diferansiye olarak sınıflandırmışlar ve iyi diferansiyasyon gösteren gastrik kanser olgularını genomik instabilite ile birlikte TGFβ-RII mutasyonunu gösterdiğini saptamışlardır. TGFβ-RII frameshift mutasyonlarının iyi diferansiye dokularda görülmesinin nedeni, geç dönemde genomik instabilite ile oluşan çeşitli mutasyonların hücrenin yaşamsal faaliyet gösteren genlerinde oluşması durumunda, hücre için ölümcül sonuçlara yol açmasıdır (Ohue et al. 1996).

Souza ve arkadaşları, genomik instabilite saptadıkları 61 kolorektal karsinoma ile görülen ülseratif kolit, 35 gastrik kanser, 26 özefagial kanser ve 16 sporadik kolorektal kanser dokusu ile yaptıkları çalışmada, 61 kolorektal karsinoma ile görülen ülseratif kolit dokusunun 3'ünde, 16 sporadik kolorektal kanser dokusunun 14'ünde TGFβ-RII geninde instabilite saptamışlardır. 35 gastrik kanser ve 26 özefagial kanser dokusunda TGFβ-RII geninde instabilite saptamamışlardır. Souza ve arkadaşları bu çalışma ile ülseratif kolite bağlı neoplastik lezyonların az bir bölümünde genomik instabilite olabileceğini ve premalign lezyonlarda TGFβ-RII geninde mutasyon saptandığını açıklamışlardır (Sauza et al. 1997). HNPCC olgularında görülen genomik instabilite ile TGFβ-RII geninde instabilite varlığı %70 ila %90 arasında değişirken, ülseratif kolite bağlı görülen neoplazilerde bu oran %27 dir (Myeroff et al. 1995, Parsons et al. 1995, Lu et al. 1995, Sauza et al. 1997).

Somowitz ve arkadaşları 100 sporadik kolrektal kanser ve 164 sporadik adenoma ile yaptıkları çalışmada, 100 kolorektal kanser olgusunu 9 tanesinde TGFβ-RII geninde instabilite saptamışlardır (%9). 164 sporadik adenomada ise instabilite saptanmamıştır (Samowitz et al. 1997).

Yapılan bu çalışmalarda, kullanılan çeşitli kanser olgularında genomik instabilite saptandıktan sonra RER(+) olan olgularda TGFβ-RII geni instabilitesine bakılmıştır. Bizim

çalışmamızdaki amacımız ise, çalışılan olgularda RER(+) liğini belirlemek değil, sadece görülen kanser olgularında TGFβ-RII geninde instabilite olup olmadığını araştırmaktır.

Kanserde aileselliğin rolünün varlığının bulunması ile ailesel geçişli kanser türlerinde birçok gende mutasyonlar tanımlanmıştır. Ailesel geçişli olarak tanımlanan HNPCC kolorektal tümörleri ve bilateral meme kanserlerinde de bir çok gende mutasyonlar saptanmıştır. Özellikle kolorektal kanserlerde görülen mismatch tamir mekanizması genlerindeki mutasyonlar ve p53 ve Ras gibi tümör baskılayıcı ve/veya onkogenlerde görülen mutasyonlar kanser gelişiminde önemli rolleri olan genlerdir. Mutatör fenotip oluşumunda, birçok gende oluşan mutasyonlar rol almaktadır. Çalışmamızda bilateral meme kanserlerinde 6no.lu olguda TGFβ-RII geninde bulunan MIN bu olgunun mutatör fenotipe sahip olmadığı konusunda bilgi vermez. Çünkü; Herhangi bir kanser türünde mutatör fenotipten söz edebilmek için, en az iki STR bölgesinde MIN(+) belirlenmesi gerekmektedir. Bazı olgu gruplarında bakılan STR bölgesinde MIN(+) liği saptanmadığı halde mutatör fenotipten sözedilebilmektedir. Bu durum genomda oluşan mutasyonların rasgele olması ile açıklanabilmektedir. Genomda repikasyon sırasında veya dış mutajenik etmenlerle oluşan yanlış baz eşleşmeleri mismatch tamir mekanizması ile tamir edilebilmektedir. Mutatör fenotipte oluşan bu tip mutasyonlar, tamir mekanizmasının çalışmaması veya hatalı çalışması yüzünden onarılamamaktadır. RER(+) olan bireylerin genomundaki tüm STR bölgelerinde MIN(+) liği görülmemektedir. Görülen instabilite, STR bölgelerinde rasgele oluşan mutasyonlardır.

Yapılan bazı çalışmalarda, ailesel geçiş gösteren bu tip kanser olgularında, görülen instabilitenin tüm aile (pedigri) çalışmaları yapılarak, sonuçların ailesel kanser insidansına göre değerlendirildiği görülmektedir. Çalışmamızda kullanılan bilateral meme tümörleri arşiv materyali olduğundan ve bu materyallerin bazıları çok eski tarihlere ait olduğundan bu bireylerin ailelerine ulaşmak çok güçtür. Kolorektal tümörlerde ise çalışılan materyal ameliyat sırasında alınan parça materyalidir. Bu olguların pedigri çalışmalarında aile bireylerinden ince iğne aspirasyon biyopsisi alınarak yapılan DNA izolasyonu ile instabilite çalışmaları yapılabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Gaytaya dökülen bağırsak epitel hücreleri ile

yapılan çalışmalar ince iğne aspirasyon biyopsilerinin alınımın güç olması nedeni ile çoğalmıştır.

Çalışmamızda, PCR amplifikasyonları, taze kolon materyalinden izole edilen DNA'lar için 30 siklus, parafin blok kesitlerinden izole edilen DNA'lar için ise 35 siklusa gerçekleştirildi. Parafin bloklardan elde edilen DNA miktarı daha düşük olduğundan bu döngü sayısı uygun bulunmuştur. Ayrıca, PCR amplifikasyonunda kullanılan taq polimeraz enzimi $MgCl_2$ ile optimize halde satılmaktadır. (Taq polimeraz (Appligene Kat.No: 120181) ve optimize haldeki taq polimeraz tamponunun $MgCl_2$ konsantrasyonunun 1.5 mM olduğu belirtilmesine rağmen yapılan optimizasyon çalışmalarında $MgCl_2$ konsantrasyonunun 2.5mM $MgCl_2$ de daha fazla ürün verdiği saptanmıştır.

Poliakrilamid jel elektroforezinde %6 lık jelde bandlar daha iyi ayrılmasına rağmen, gümüş boyama sırasında, jel kırılabilirliğinin fazla olması ve bant boyanmasının kötü olması nedeni ile %8 lik jel kullanılmıştır. Yine başlangıçta 19:1 kroslink (Akrilamid/ N,N' -metilen-bis-akrilamid) kullanılırken bant kalitesinin daha iyi olması nedeni ile 39:1 kroslink (Akrilamid/ N,N' -metilen-bis-akrilamid) kullanılmıştır. Bantların netliğinde yüklenen örnek miktarı da önemli bulundu.

Poliakrilamid jel elektroforezi sırasında yüklenen örnek miktarı fazla olduğunda bandların yaygın çıktığı gözlemlendi. Örnek miktarı fazla olduğunda denatürasyonun tam olarak gerçekleşmediği düşünüldü. Literatürde PCR ürünlerinin 1:1 oranında yükleme tamponu ile dilüe edilmesi önerilmektedir. Bizim çalışmamızda da PCR ürünleri yükleme tamponu ile 1:1 oranında dilüe edilmiş ve 2 μ l olarak jele yüklenmiştir.

Çalışmamızda poliakrilamid jel elektroforezinde bantların görüntülenmesinde non radioaktif bir yöntem olan gümüş boyama yöntemi kullanılmıştır (Kim et al 1995). Bu yöntem, ekonomik ve duyarlılığı yüksek bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Çalışmada hazır kit kullanmak yerine, kendi hazırladığımız solüsyonlar kullanılması, yöntemin daha ucuza mal olmasını sağladı.

Gümüş boyamada dikkat edilmesi gereken diğer bir önemli nokta ise, jelin boyadan arındırılması için gereken yıkama işlemidir. Bu basamağın her labratuvar tarafından kendi

koşullarına göre ayarlanması gerekmektedir. Çalışmamızda en iyi sonuç, 30 saniye için alınmıştır. Daha düşük zamanlarda yapılan çalışmalarda developer ile muamele sırasında kahve rengi, siyah çökeltilerin oluştuğu saptanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan 15 kolrektal dokunun patolojik incelemelere göre 13 ünün adenokarsinom olduğu belirlendi. Önceki yayınlarda adenokarsinomlarda, TGF β -RII geninde instabilite varlığı %9 olarak bildirilmiştir. 26 bilateral meme dokusunda yapılan çalışmada sadece bir olguda görülen TGF β -RII geni mutasyonu, bu tümör tipinde fazla çalışma olmayışı nedeni ile literatürler eşliğinde değerlendirilememiştir. Bilateral meme tümörleri erken yaşta görülmesi ve çift meme tutulumu ile karakterize bir neoplazmdır. Bu tümöral dokuların çalışmaya dahil edilmesinin nedeni, bu tip tümörlerin ailesel geçiş göstermesi ve erken yaşta görülmesi nedenleri ile germ-hattı mutator fenotip bulunma olasılığının yüksek olduğunu düşünmemizdir.

Çalışmamızda kolorektal olguların hiç birinde TGF β -RII geninde instabilite varlığının görülmeşi vaka sayısının azlığından olabilir. Çalışmamızın bundan sonraki aşamasında kolorektal doku örneklerinin artırılması yoluna gidilecektir. Dokuların TGF β -RII geninde MIN varlığı bakıldıktan sonra bu olguların diğer STR bölgelerindeki MIN varlığına bakılarak, instabilite bulunan örneklerde p(A)₁₀ bölgesindeki adenin sekansındaki artmalar veya azlımaların kaç baz olduğunu DNA dizi analizinde saptanması planlanmaktadır.

6.KAYNAKLAR

- Akiyama Y., Iwanaga R., Saitoh K. (1997); Transforming growth factor β type II receptor gene mutations in adenomas from hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* Vol.112 33-39
- Alexandrow M.G., Moses H. L. (1995); Transforming growth factor β and cell cycle regulation. *Cancer Research* 55, 1452-1457
- Antar L. G., Antonia T. M., Antonia S. J. (1995); Missense mutations of the transforming growth factor β type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Research* 55, 3982-3987
- Antonia T. M., Li X., Reiss M. (1996); A mutation in the transforming growth factor β receptor type II receptor gene promoter associated with loss of gene expression. *Cancer Research* 56, 4831-4835
- Baker SM., Bronner CE., Zhang L., (1995); Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell* 82:309-319.
- Bodmer W., Bishop T., Karran P. (1996); Genetic steps in colorectal cancer. *Nature Genetics* Vol.6 217-219
- Boyer J. C., Umar A., Risinger J. I. (1995); Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. *Cancer Research* 55, 6063-6070
- Brentnall TA.,(1995); Microsatellite instability, shifting concepts in tumorigenesis. *American J. of Pathology*, 147(3):561-563.
- Bronner C. E., Baker S. M., Morrison P. T. (1994); Mutations in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* vol.368 258-261
- Chen J., Heerdt B. G., Augenlicht L. H. (1996A); Presence and instability of repetitive elements in sequences the altered expression of which charecterizes risk for coloning cancer. . *Cancer Research* 54, 174-180

- Chen X. Q., Stroun M, Magnenat J. L. (1996B); Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nature Medicine* vol. 2 1033-1034
- Chong J. M., Fukayama M., Hayashi Y. (1994); Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Research* 54, 4595-4597
- Chung Y. J., Song J. M., Lee J. Y. (1996); Microsatellite instability-associated mutations associate preferentially with the intestinal type of primary gastric carcinomas in a high-risk population. *Cancer Research* 56, 4662-4665
- Clark A. F. (1996); *The molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Plenum press, New York
- Cooper M. G. (1997); *North America* by Oxford University Press.
- Costa LT., Liu B., El-Deiry WS., Hamilt n SR., Kinzler KW., Vogelstein B., Markowitz S., Wilson JK., de le Chapelle A., Downey KM., So AG.(1995); Polymerase delta variants in RER colorectal tumors. *Nature Genetics* 9:10-11.
- Croxtall J. D., Jamil A., Ayub M. (1992); TGF- β stimulation of endometrial and breast-cancer cell growth.. *Int. J. Cancer* 50 822-827
- Datto Y. Li., Panus J. F. (1995); Transforming growth factor β induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanisim. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol.92 5545-5549
- De Vita V. T., Hellman S., Rosenberg S.A,(1997): *Cancer: principles and practice of oncology*. 5th ed. Lippincot-Raven Publishers.
- Dulic V., Lees E., Reed S. I. (1992); Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*, 1958
- Flores R. H., Kelman Z., Dean F. B. (1994); cdk interacting protein 1 directly bind with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase δ holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8655
- Gene cards for TGF- β Receptors (1998); <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards>
- Gene cards for TGF- β -RI (1998); <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards>
- Gene cards for TGF- β -RII (1998); <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards>
- Gene cards for TGF- β -RIII (1998); <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards>
- Gold L. I., Sexena B., Mittal K. R. (1994); Increased expression of transforming growth factor β isoforms and basic fibroblast growth factor in complex hyperplasia and

adenocarcinoma of the endometrium: evidence for paracrine and autocrine action. *Cancer Research* 54, 2347-2358

- Gold L. I., Sung J. J., Siebert J. W. (1997); Type I (RI) and Type II (RII) receptors for transforming growth factor β isoforms are expressed subsequent to transforming growth factor β ligands during excisional wound repair. *American journal of pathology* vol.150 209-222
- Grady W., Rajput A., Myeroff L. (1997); What's new with RII ? *Gastroenterology* Vol.112 297-302
- Hahn S. A., Schutte M., Hoque A. T. M. S. (1996); DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* vol.271 350-353
- Hannon G. J., Beach D. (1994); P15INK4B is potential effector of TGF β - induced cell cycle arrest. *Nature* 366: 701
- Hearn C.M., Ghosh S., Todd J.A.(1992): Microsatellites for linkage analysis of genetic trails. *Trends in Genetics*. Vol 8(8):288-294.
- Ionov Y., Peinado MA., Malkhosyan S., Shibata D., Perucho M., (1993): Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis, *Nature* 363:558-561
- Jiricny J. (1996): Mismatch Repair and cancer. *CSH Cancer Surveys* Vol:28. Genomic instability in Cancer , Imperial Cancer Research Found., 47-68.
- Kim C. J., Kim W. H., Kim C. W. (1995); Detections of 17p loss in gastric carcinoma using polymerase chain reaction. *Laboratory investigation* 232-236 vol.72
- Kinzler K. W., Vogelstein B. (1996); Lessons from hereditary colorectal cancer. . *Cell* Vol. 87 159-170
- Koff A., Giardano A., Desal D. (1992); Formation and activation of cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 1992 257, 1689
- Koli M. K., Arteaga C. L. (1997); Predominant cytosolic localization of the type II transforming growth factor β receptor in human breast carcinoma cells. *Cancer Research* 57, 970-977
- Kunkel TA., (1993): Slippery DNA and diseases. *Nature* 365:207-208.
- Levine A. J. (1992); Transforming growth factor β . *Tumour Suppressor Genes the cell Cycle and Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory press vol.12

- Loeb L. A. (1994); Microsatellite instability: Marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Research* 54, 5059-5063
- Lu S.L., Akiyama Y., Nagasaki H. (1995); Mutations of the transforming growth factor β type II receptor gene and genomic instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol. 216 452-457
- Lu S.L., Zhang W. C., Akiyama Y. (1996); Genomic structure of the transforming growth factor β receptor type II receptor gene and its mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Cancer Research* 56, 4595-4598
- Mackay S. L. D., Yaswen L. R., Tarnuzzer R. W. (1995); Colon cancer cells that are not growth inhibited by TGF- β lack functional type I and type II TGF- β receptors. *Annals of Surgery* vol. 221 767-777
- Markowitz S., Wang J., Myeroff.L. (1995); Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancers cells with microsatellite instability. *Science* vol.268 1336-1338
- Marra G., Boland C. R.. (1995); Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *Journal of the national cancer institute* vol.87 1114-1122
- Marx J. (1995); DNA repair defect tied to mutated TGF- β receptor gene. *Science* vol.268 1276-1277
- Mathews K. C., Van Holde K. E. (1990); The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Meuth M. (1996); Patterns of mutations in cancer cells CSH, *Cancer Surveys* Vol.28: Genetic instability in cancer 33-46 Imperial Cancer Research Found.33-46.
- Meyers M., Theodosiou M., Acharya S. (1997); Cell cycle regulation of the human DNA mismatch repair genes hMSH2, hMLH1, and hPMS2. *Cancer Research* 57, 206-208
- Miller JH., (1996); Bacterial mutators and human cancer. CSH, *Cancer Surveys* Vol.28: Genetic instability in Cancer Imperial Cancer Research Foundation 141-143.
- Minnick DT, Kunkel TA (1996); DNA synthesis errors, mutators and cancer. CSH, *Cancer Surveys* Vol.28: Genetic instability in Cancer Imperial Cancer Research Foundation, 3-20.
- Mironov N. M., Aguelon M.A., Potapova G. I. (1994); Alterations of (CA) $_n$ DNA repeats and tumor suppressor genes in human gastric cancer. *Cancer Research* 54, 41-44

- Myeroff L.L., Parsons R., Kim S.J. (1995); A transforming growth factor β receptor type II receptor mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Research* 55, 5545-5547
- Nevins J.R. (1992); E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258, 424
- Nicolaides N. C., Papadopoulos N., Liu B. (1994); Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* vol.371 75-79
- Ohue M., Tomita N., Monden T. (1996); Mutations transforming growth factor β type II receptor gene and microsatellite instability in gastric cancer. *Int. J. Cancer* vol. 68 203-206
- Palombo F., Galinari P., Iaccarino I. (1995); GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* vol.268 1912-1914
- Papadopoulos N., Nicholas C., Liu N. B. (1995); Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science* vol. 268 1915-1916
- Pardee A. B. (1989); G1 event and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603
- Parsons E. R., Li G. M., Longley M. (1994); Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells. *Science* vol.268 738-740
- Parsons R., Myeroff L.L., Liu B. (1995); Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor β type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Research* 55, 5548-5550
- Renault B., Calisri D., Buonsanti G. (1996); Microsatellite instability and mutations of p53 and TGF- β RII genes in gastric cancer. *Hum. Genet.* Vol.98 601-607
- Rooney M. T., Henry J. B. (1991); Molecular markers of malignant neoplasms. *Clinical Diagnosis Management by Laboratory Methods*, Saunders Company 18 (4): 285-307
- Samowitz W. S., Slattery M. L. (1997); Transforming growth factor β receptor type II mutations and microsatellite instability in sporadic colorectal adenomas and carcinomas. *American journal of pathology* vol.151 33-35
- Sauza R. F., Lei J., Appel R. (1997); A transforming growth factor β 1 receptor type II mutation in ulcerative colitis-associated neoplasms. *Gastroenterology* Vol.112 40-45
- Serra R., Moses H.L. (1996); Tumor suppressor genes in the TGF- β signaling pathway ? *Nature Medicine* vol.2 390-391

- Serrano M., Hanno G. J., Beach D. (1993); A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/cdk4. *Nature* 366, 704
- Shibata D., Navidi W., Salvoara K., Li Z-H., Aaltonen LA., (1996); Somatic microsatellite mutations a molecular tumor clocks. *Nature Medicine* 2:676-681.
- Shibata D., Peinado M. A., Ionov Y. (1994); Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nature Genetic* vol.6 273-281
- Shiuji MKK., Kenny MK., Wood RD.,(1992); Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69:367-374.
- Strachan T., Read A.P. (ed.)(1996); *Human Molecular Genetics* First ed. Bios Scientific Publishers Ltd.
- Strickler J. G., Zheng J., Shu Q. (1994); p53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: When guardians fail. *Cancer Research* 54, 4750-4755
- Takenoshita S., Hagiwara K., Nagashima M. (1996); The gene encoding the human enomic structure of the transforming growth factor β receptor type II receptor(TGF- β RII). *Genomics* 36, 341-344
- Thibodeau S. N., Bren G., Schaid D. (1993); Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. . *Science* vol.260 816-819
- Togo G., Toda N., Kanai F. (1996); A transforming growth factor β receptor type II receptor gene mutation common in sporadic cecum cancer with microsattelite instability. *Cancer Research* 56, 5620-5623
- Tomlinson I. P. M., Novelli M. R., Bodmer W. F. (1996); The mutation rate and cancer. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol.93 14800-14803
- Umar A., Buermeyer AB., Simon JA., Thomas DC., Clark AB., Liskay RM., Kunkel TA., (1996); Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* 87:65-73.
- Vogel F., Motulsky A.(1997); *Human Genetics Problems and Approaches*. Third Ed. Springer-Verlag.
- Wang C. Y., . Eshleman J. R, Willson J. K. V. (1995); Both transforming growth factor β and substrat release are inducers of apoptosis in a human colon adenoma cell line. *Cancer Research* 55, 5101-5105

- Wang T., Donahoe P. K., Zervos A. S. (1994); Specific interactions of type I receptors of the TGF- β family with the immunophilin FKBP-12. *Science* vol.265 674-676
- Wind N., Dekler M., Beras A., Radman M., te Reile H.(1995): Inactivation of mouse Hsh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination and predisposition to cancer. *Cell* 82:321-330.
- Wood RD., Shiuji MKK.,(1997); Which DNA polymerases are used for DNA repair in eukaryotes, *Carcinogenesis* 18(4):605-610.
- Wooster R., Jansen A. M. C., Collins N. (1994); Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nature Genetics* vol.6 152-156
- Wrana J. L., Attisano L., Wieser R. (1994); Mechanism of activation of the TGF- β receptor. . *Nature* vol. 370 341-346
- Xiong Y., Hannon G. H., Zhang H., Casso D., Kobayoshi R., Beach D. (1993); p21 is universal inhibitor of cyclin kinases.
- Yee C. J., Roodi N., Carmel S. (1994); Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Research* 54, 1641-1644