

İNCELEME YAZILARI

KOLOREKTAL KANSERLERİN OLUŞUMUNDA MOLEKÜLER GENETİK DEĞİŞİKLİKLER

MOLECULAR GENETIC BASIS ON CARCINOGENESIS OF COLO-RECTAL TUMORS

Orhan TERZİOĞLU

SUMMARY

Colorectal carcinogenesis evolves in the results of multi-step genetic differentiation.

In the process several chromosomal (5q, 18q,17q) supressor genes deletions and also onco-gene (K-ras) activation sequantially observed.

In hereditary non-polypoid colorectal carcinoma (HNCC) additional differentiation were observed in chromosome (2p, 3p) the genes related DNA mismatch repair.

(Keywords: Chromosom Anomaly, Tumorigenesis.)

ÖZET

Kolorektal kanserler çok basamaklı genetik farklılaşmaların sonunda ortaya çıkmaktadır.

Bu olayda değişik kromozomlardaki (5q, 18q, 17p) baskılayıcı genlerde kayıplar ve ilaveten onkojenlerde (K-ras) ardışık aktivasyonlar gözlenir.

Polipoid olmayan kalıtsal kolorektal kanserlerde bunlara ilaveten kromozomlarda (2p, 3p) yeralan DNA yanlış eşleşim tamiri genleriyle ilgili olarak farklılaşmalar bulunmuştur.

(Anahtar Sözcükler: Karsinogenez, Kromozom Anomalileri, Tumorigenez.)

Günümüzde kanser ve genetik yapı arasındaki yoğun çalışmaların geçmişine baktığımızda önemli atılımların olduğu görülmektedir. XIX. Yüzyılın ikinci yarısında, canlılarda nesiller arasında karakterlerin, belirli sayısal düzenlerde aktarıldığı bulundu. Mikroskop ve değişik kimyasal madde ve metodların uygulamaya girmesi ile canlıların hücrelerden yapıldığı, çekirdeklerin oluşumları gibi çok önemli bulgular elde edildi. Kanser Oluşumu ile çevresel etkiler arasında epidemiyolojik bulgular yayınlanmaya başlandı. XX. Yüzyılın ilk yarısında, kısıtlı laboratuvar olanakları ile değişik bulgular ve açıklamalar geliştirildi. Bovari 1914'te kanserin genetik bir hastalık olduğunu yayınladı. Röntgen ışınının bulunması, deneysel kanser araştırmalarında gelişim sağladı. Kimyasal kanserojenlerle oluşturulan kanserlerin, fareden fareye aktarılabilmesi, hücrelerde belirli değişikliklerin korundukları görüldü. Kalıtsal maddenin moleküler düzeyde aydınlatılması yönünde yapılan çalışmalarla, 1953 de "Deoksiribo Nükleik Asidin (DNA) çift sarmalının yayınlanması, canlılık hakkındaki bilgiye moleküler boyut kazandırdı. 1956-1958 de insan hücrelerinde kromozom sayısının 46 olduğu kesinlik kazandı. 1960 da ise ilk kez, hematolojik sistem kanserlerinden kronik miyeloid lösemilerde KLM (Chronic myelocytic leukemia - CML), uzun kolunda kopukluk gözlenen G grubu kromozom yapısının bulunduğu yayınlandı. Bu yapıya bulunduğu şehrin isminden dolayı Philadelphia kromozomu adı verildi. Böylece kanser ile ilk genetik bilginin taşındığı kromozomlar arasında ilk doğrudan ilişki kuruldu. Bu tarihten sonra geçen 34 yılda kromozom DNA hücresel kontrol ve iletişim mekanizmaları düzeyindeki araştırmalar giderek arttı. Elde edilen verilere bağlı olarak kanser, moleküler, hücresel ve organizma düzeyinde daha iyi anlaşılmaya başlandı. Sonuçta daha olumlu korunma, tanı, tedavi takibi ve tedavi protokolleri geliştirildi. Bu metinde gastroentestinal kanserler konusunda elde edilen bulgular moleküler genetikteki bulgular ve klinik yönden gelişen yeni yaklaşımlar ana hatlarıyla ve-

rilmeye çalışacaktır.

Hem kromozomlar ve hem de moleküler genetik düzeyde yapılan çalışmalar kanserin esas olarak genetik bir hastalık kavramı ile, yukarıdaki tanımda geçenler arasında önemli farklar bulunmatadır. Yerleşik tanımda, sadece anne ve babadan kalıtılan karakterler dikkate alınarak, çocuktaki karakterlerin değişmeden oluştuğu ifade edilir. Genetik bilgi dööl hücrelerinde taşınır ve çocukta anne ve babadan kazanılana uygun işleyiş gösterir. Yeni genetiğin kazandırdığı kavram ise, döllenme sonrasında da hem genetik bilginin tümü, hem de en temel birimi olan nükleik asitler düzeyindeki işleyiş ve sonuçların incelenmesidir. bu aşamada önemle belirtilmesi gereken, kalıtsal madde değişikliklerin olmasıdır ki bunlar genel olarak mutasyon terimi ile ifade edilirler. Adenin, Guanin, Timin ve Sitozin'in oluşturduğu dört çeşit nükleik asidin yapılarında yer alan şeker ve fosfor grupları aracılığı birleşmeleri, DNA'nın tek ipliğini oluşturur. Bu iplik üzerinde A, G, ve C'nin sıralanışında genetik bilgi dizini oluşturur. İnsan hücrelerinde çift iplik olarak bulunan DNA'nın oluşumu, bir iplikteki A'nın karşısında diğerindeki T'nin, G'nin karşısına ise C gelmesi ile oluşur. Bu durum A:T ve G:C çifti olarak adlandırılır. Bunlardan birinin örneğin A'nın yerine G yerleştirildiğinde, diğer iplikte halen eskiden bulunan T buluncaktır. Bu bir mutasyondur. Sonunda G ve T'nin birbiriyle bağlantı kurup eşleşmeleri mümkün olmadığıdan, DNA da hatalı eşleşme (mismatch) durumu ortaya çıkar. Sağlıklı bir hücrede, yapılan bu hatalar fark edilir. Özgül tamir mekanizmalarıyla hatalı bölge kesilip atılır ve yerine doğru nükleik asitler yerleştirilir. Bu mekanizmaların işlememesi durumunda hatalar yerleşir. 1994 te özellikle kolon kanserlerinde bu olayla ilgili bulgular, yeni değerlendirmelere yol açmıştır. (1-6, 14). Nükleik asit düzeyinde olan bu mutasyonlarla birlikte kromozomların bir parçasının kopup ayrıldığı delesyon veya kromozom parçalarının yer değiştirdiği translokasyon-ara değişik kanserler de gözlenmektedir (12). Genetik has-

talıklarda mutasyonlar döl hücrelerinde (mitokondri dışında) taşınmaktadır. Ancak kanser olgularında ailesel eğilim olsa da, önemli bir farklılık olarak vücut hücrelerinde somatik hücrelerdeki mutasyonlar önem kazanmaktadır. Bilinen genetik hastalıklardan, kanserin önemli bir ikinci farkı daha bulunmaktadır. Akdeniz anemisi, sistik fibrozis ve benzeri genetik hastalıklarda tek bir mutasyon hastalığın oluşumu için yeterli olmaktadır. Ancak kanser oluşumunda genetik bilgi düzeyinde, 4-7 veya daha fazla mutasyonun aynı hücrede oluşması gerekmektedir. (7-13). Bu düşünce "çok basamaklı" (multistep) karsinogenesis olarak daha geniş bulgularla destek bulunmuştur. Eğer tek bir mutasyon sonucunda kanser oluşsa idi, yılda gözlenen kanser sayısının günümüzde kaydedilenden bin ila on milyon kez daha fazla olması gerekirdi. Yapılan epidemiyolojik araştırmalarda kolorektal kanserlerin 30 - 40 yaş grubunda, yüzbinde 1-5 arasında rastlanmasına karşın, doğrusal bir artışla 70-80 yaş grubunda 50-100 vakaya ulaştığı bulunmuştur. Bu bulgular birçok şekilde açıklanacağı gibi, laboratuvar çalışmalarına en uygun düşeni bir çok hücrede, kansere neden olabilecek mutasyonların tek tek olabileceği, fakat kanserin oluşmamasıdır. Ancak birden fazla mutasyonun aynı hücrede bir arada oluşması, kanserli hücre serisinin oluşumuna yol açmaktadır ki bu da daha uzun zaman gerektirmektedir. Bir başka ifade ile ilerleyen yaş, farklı mutasyonların ardarda aynı hücrede olma ihtimalini arttırmakta ve kanser sıklığı da buna bağlı olarak yükselmektedir (7, 15-21).

Kanser araştırmalarında temel soru "Hangi genetik bilgi veya bilgiler bu olayda rol oynamaktadır." yönünde gelişmiştir. Yakın zamana kadar elde edilen bulgular hücrelerin kanser oluşumu yönünde gelişimlerine yol açan onkogenler ve bu oluşumu engelleyen-başkalayan anti-kanser etkiye sahip supresor genlerin bulunmasına yol açmıştır. Bu durumda ortaya çıkan önemli bir soru da onkogen ve supresor genlerin etkileri arasında normal yaşam veya kanserleşme yönünde gelişime yönelişin kontrolünü

sağlayan bir grup genetik bilginin olması yönündedir ki, bu alanda bilinenler ilk iki gen grubuna karşın çok azdır. Bu mekanizmalara, son birkaç yılda eklenen bir dördüncü olay da hücrelerde oluşan mutasyonların tamirini düzenleyen genetik bilgilerdeki değişimdir. Tamir sisteminin bozulduğu hücrelerde, mutasyonların ardarda birikiminin normaldekenden çok daha hızlı olacağı beklenir ki bu çocukluk çağı kolorektal kanserlerin nedeninin moleküler genetik düzeyde açıklanmasına yol açmıştır (14).

Kanser oluşumuna yol açan genlerle ilgili ilk bilgiler RNA virüsleriyle yapılan çalışmalarda elde edilmiştir. Bu virüsler esas olarak üç genetik bilgi bulundururlar. İki yapısal proteinleri şifreler. Üçüncü, RNA olan genetik bilgiden, DNA sentezini sağlayan ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi kodlar. Bu virüslerin bazılarında tümör oluşumuna yol açan bir dördüncü gen bulunmaktadır. Hücrelerde transformasyona yol açan bu viral onkogenler (oncogen) v-onc kısaltması ile verilmektedir. Bu genetik bilgilerin dizi analizleri yapıp kendileri izole edildiğinde, insan hücrelerinde karşılıklı olarak aranmış ve v-onc ların insan hücrelerinde homologlarının bulunduğu gözlenmiştir. Hücresel (cellular) onkogen adı verilen bu birimler c-onc olarak andlandırılmaktadır (22). Bu bulgu, viral onkogenlerin hücresel kaynaklı olduğunu ve artımı kontrolden sorumlu olduklarını ortaya çıkardı. Yanlış anlamaya yol açacak şekilde bu genlere onkogen adının verilmesi başlangıçta tümör oluşumuna yol açan virüslerle ilgili olarak elde edilmiş olmalarındandır. Hücrelerde normal artımı kontrol eden karşılıkları ise daha sonra proto-onkogen olarak adlandırılmışlardır. Böylece, civcivlerde myelocytomatosis'e yol açan v-myc ve sarcoma yol açan v-src ilk yayınlananlar arasında yer aldı (23). Daha sonra ras onkogeni bulundu ve insan kromozomlarında 12q da (12. kromozomun q kolunda) yerleşik olduğu gösterildi. Sadece myc veya ras onkogenlerinden birinin konulduğu transgenic farelerde 150. gün civarında %20 ve %40 düzeyinde tümör gözlemlendi. Ancak her ikisinin birden

yerleştirildiği farelerde aynı sürede % 100 düzeyinde tümör oluşumu saptandı. Geliştirilen araştırmalarda kolorektal kanserlerin %50-80' inde aktive olmuş ras onkogeni gözlemlendi (7, 14).

Bazı kanserlerin oluşumunda özellikle belirli kromozomal bölgelerin olmadığı veya değişikliğe uğradığı gözlenmiştir. Retinoblastoma görülen çocuklarda ve ailelerinde yapılan çalışmalarda, 13. kromozomun uzun kolunda değişiklik gözlenmiştir. Bu değişikliğin hastada sadece tümör bulunan bölgede değil, diğer hücrelerinde de gözlenmesi olayın ailesel kalıtıldığını düşündürmüştür. Yapılan moleküler çalışmalarda, genin, ürünün hücreyi transforme edici birçok proteinle birleşmesiyle bu etkiyi kaldırdığı gözlemlendi.

Böylece supresor gen olarak retinoblastoma RB yayınlandı (24, 25). Benzer yaklaşımla kolorektal kanserler incelendiğinde, değişik kromozom kayıpları görüldü. 17 kromozomun kısa kolunda 13.1 olarak belirlenen alanda delesyon, hastaların %90 unda rapor edildi.

Bu bölgenin ürünü olan protein 53 KDV (kiloDalton) luk olduğundan, kısaltma yapılarak p53 adı verildi. 375 aminoasitlik olan bu proteinin, transforme hücrede aşırı hücre çoğalmasını önlediği gözlemlendi. Tümörlerden elde edilen örneklerde ya17p 13.1 in her iki kromozomda da kaybedildiği, ya da birinde kayıp birinde mutasyona uğradığı saptandı. Kromozomlardan her birinde farklı bölgelerde mutasyona rastlanan durumlar da rapor edildi. Mutasyonlar çoğunlukla kanser oluşumu ile P53 arasındaki ilişkinin Fearon ve arkadaşlarınca yayınlanmasından sonra, birçok araştırmacı konuyu destekleyen veriler elde etti ve p53 proteini ölçümü, moleküler değişikliğin tayini klinik incelemeler arasında yerini aldı (7, 18, 19, 26, 27).

Ailesel olarak adenomatöz polipozis görülenlerde, 5 nolu kromozomun uzun kolu 21 alanında olayla ilgili gen tanımlandı ve (Familial Adenomatous Polyposis) FAP geni olarak isimlendirildi. 5q21 de yerleşik bu gen bölgesinde değişik alanlarda binlerce adenomatöz polip gelişmekteydi. Bu bölgeyle yapılan çalışmalarda ikinci supresor

etkili ürün bulundu ve mutasyona uğramış kolorektal kanser geni (Mutated Colorectal) kanserin başlangıç dönemlerinde ve Mc'nin sporadik olgularda yer aldı gösterildi. FAP ile aynılığı anlaşılan APC geni, adenomatous polipozis koli kısaltması olarak yayınlarda yer aldı (7, 28, 29).

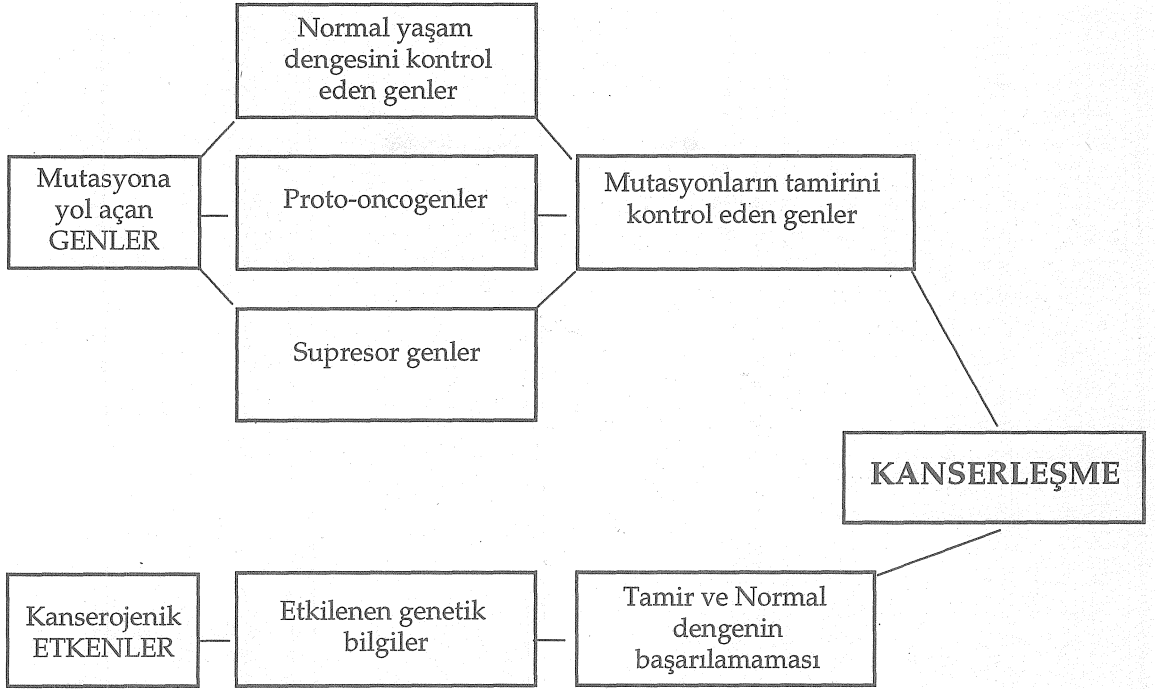
1990 da kolon karsinomlarının %70 inde delesyona uğramış bir onkogen daha bulundu. Bu bulgudan esinlenerek DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma) supresor geni adı verildi ve 18 nolu kromozomun uzun kolunda yerleştiği gösterildi. Hücre yüzeyinde tutunmayı sağlayan protein sentezinde rol oynadığı gösterildi. 11 kb lık olan RNA transkriptinin normal beyin hücrelerinde oldukça fazla sentezlendiği de yayınlarda yer aldı. (7, 30).

Bütün bu bulgular değişik araştırmacılar tarafından bir arada değerlendirildi. Özellikle Vogelstein'in içinde yer aldığı grup çok basamaklı kanser oluşumunu pratikte yararlanılabilir bir akış şeması ile yayınladı (7) (Tablo 1)

Kolorektal kanserlerin oluşumunda başlangıç aşamasında iyi huylu adenoma görülmektedir. p53 kaybı karsinomaya geçişte önemli olmaktadır. Klinik değerlendirmelerde ve cerrahi uygulamalarda alan belirlemede, örneklerin moleküler analizinin uygulandığı merkezler oluşmaya başlamıştır. RFLP, PCR, blotting gibi değişik moleküler genetik teknolojilerle, genlerin durumu, kromozomlardaki bilgilerden birinin kaybı (Lost of Heterotigosity) LOH değerlendirilmeye tedavi planlaması yapılmaktadır. Ayrıca önemli ölüm nedeni olan karaciğer metastazı olasılığı daha doğrulukla öngörülebilmektedir (7, 13, 30).

Tüm bu mekanizmalara ek olarak çocukluk çağında kolorektal kanser görülen ailelerde, olayların beklenenden en az 10 kez daha hızlı gelişimi, farklı etken genlerin olabileceğini düşündürdü. Mutasyonların ardarda aynı hücrede oluşabilmesi için uzun zaman gerekmesine karşın, benzer olayların kısa zamanda oluşumu normalde olan mutasyon tamir mekanizmasının işlememesi ile açıklanabilirdi. Deneysel kanıt elde edilebilmesi için uzun yıllardan beri bilinen

TABLO 1: Kanser Oluşuna Genetik Mekanizmalar



TABLO 2: Kolorektal kanserlerin erken ve geç yaşta görülmesinde etkili moleküler değişimler

1-İleri yaştaki değişimler:

| Hüresel değişimler | İlgili kromozomlar | Genler ve değişimleri |
|------------------------------|--------------------|--------------------------------|
| Normal epitel | 5q | FAP, APC Kaybı MCC Değişimi |
| Aşırı çoğalan epitel (polip) | Farklı Kromozomlar | Düşük Metilasyon |
| Erken adenom | 12q | K-RAS Aktivasyonu |
| Adenoma-geçiş | 18q | DCC Kaybı |
| Geç adenom | 17q | p53 Kaybı veya Mutasyonu |
| Karsinom | 22p | Diğer Mutasyonlar |

METASTAZ**2-Erken yaştaki değişimler**

| | | |
|---|----------------------------|------------------------------------|
| DNA Tamir bozuklukları (yukarıdaki değişikliklerin hızlı yığılım nedenleri) | 2p22-21 2p15-16 3p21 | hMSH2 Mutasyonu hMSH1 Mutasyonu |
|---|----------------------------|------------------------------------|

Escherichia coli deki yanlış eşleşim tamir mekanizmasının benzeri maya ve insan hücrelerinde araştırıldı. Burada DNA çift sarmalını oluşturan ipliklerden birinde olması gerekenden farklı bir nükleik asit yerleşimi A:T G:C çiftleşmesini bozmakta, yanlış eşleşim (mismatch) ortaya çıkmaktadır. E. coli de mutS bu bölgeyi tanımakta, mutL başlatılmaktadır.

Bu genlerin karşılıkları ufak farklarla S. cerevisiae de mutS karşılığı MSH2 ve mutL karşılığı MSH1 genetik bölgeleri adlandırmanın başına h harfi konularak belirlendi. Bakteriden insana kadar korunan bu genetik bilgide, canlılar arasında küçük yapısal farklar da belirlendi. Polipozisin yaygın olarak görülmesine bağlı olmayan, çocukluk kolorektal kanserleri, kalıtsal, polipoid olmayan kolorektal kanserler (Hereditary Non-Polipoid colorectal carcinoma) HNPCC olarak adlandırıldı. h MSH2 geninin 2. kromozomunda (2p22-21, 2p15-16) ve hMSH1 geninde 3.kromozomda (3p21)de bulunduğu gösterildi (14).

Böylece kanser oluşumunun yaşla birlikte artışı açıklayan ve 1993 e kadar geçerli olan şemanın aynı zamanda çocukluk çağı kanserlerinde de geçerli olabileceği görüldü. Hızla gelişen kanser moleküler genetiği çalışmalarıyla, anlaşılamayan birçok konunun giderek aydınlatılacağı ve muhtemelen yeni soru ve alanların açılacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Darnell J, Lodish H, Baltimore D, *Molecular Cell Biology*. (II.ed) New York Sci Ame Inc. 1990.
2. Verma RS, Babu A. *Human Chromosomes*. New York Pergamon Press. 1989.
3. Weatherall D. *The New Genetics and Clinical Practice*. Oxford Uni. Oxford Press 1991.
4. McKusick Va. *The Morbid Anatomy of the Human Genome*. Bethesda Howard Hughes Medical Institute. 1988.
5. Butturini A, Gale RP. Detecting minimal residual leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1991 ; 52 : 19-26.
6. Sirota K. *Cancer genes in gastrointestinal malignancy* Bailliere's *Clinical Gastroenterology* 1990 ; 4 : 135-50.
7. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends in Genet.* 1993 ; 4 : 138-41.
8. Nowall PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976 ; 194 : 23-8.
9. Knudson AG. Mutation cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1971 ; 68 : 820-3.
10. Murphree AL, Benedict WF, *Retinoblastoma clues to*

human oncogenesis. Science 1984 ; 223 : 1028-33.

11. Knudson AG. Hereditary cancers: clues to mechanisms of carcinogenesis. *Br J Cancer*. 1989 ; 9 : 661-6.
12. Mitelman F, Heim S. Chromosome abnormalities in cancer. *Chromosomes and Cancer* 1990 ; 14 : 527-36.
13. Iino H, Fukuyama M, Maeda Y et al. Molecular genetics for clinical management of colorectal carcinoma. *Cancer* 1994 ; 7/3 : 1324-31.
14. Jiricny F. Colon cancer and DNA repair: have mismatches set their match. *Trends in Genet.* 1994 ; 10 : 164-8.
15. Marx J. Many gene changes found in cancer. *Science* 1989 ; 246 : 1386-8.
16. Tanaka K, Oshimura M, Kilcuchi R, et al. Suppression on tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 5 or 18. *Nature* 1001 ; 349 : 340-2
17. Baker SJ, Preisinger AC, Jesup JM, Paraskeva C et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*. 1990 ; 50 : 7717-22.
18. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 ; 61 : 759-67.
19. Fearon ER, Jones PA. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB* 1992 ; 6 : 2783-90.
20. Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes and anti-oncogenes. *Cancer Res* 1985 ; 45 : 1437-43.
21. Hamilton SR. Molecular genetics of colorectal carcinoma *Cancer* 1992 ; 70 : 1216-21.
22. Bishop JM, Varmus HE. Function and Origins of Retroviral Transforming Genes. In Weiss R, Teich N, Varmus HE and Coffin J (Eds) *Molecular Biology of Tumour Viruses. Part III. RNA Tumour Viruses* New York: Cold Spring Harbor Press; 1982 : 999-1108.
23. Bishop JM. Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann Rev Biochem.* 1983 ; 52 : 301-3.
24. Dryja TP, Cavene W, White R, et al. Homozygosity of chromosome 13 in retinoblastoma. *New Eng J Med* 1984 ; 310 : 550-3.
25. Lee WH, Brookstein R, Hong P, Young LJ, Lee EH. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning identification and sequence. *Science* 1987 ; 253 : 1394-9.
26. Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K, Syrjanen K. The p53 suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroent.* 1993 ; 88 : 174-85.
27. Mc Bride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17P13). *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1986 ; 83 : 130-4.
28. Bodmer WF, Bauley CJ, Bodmer J, Bussey HJR, Ellis A. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987 ; 328 : 614-6.
29. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancer. *Science* 1987 ; 251 : 1366-70.
30. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990 ; 247 : 49-56.
31. Khine K, Smith DR, Goh Hs. High frequency of allelic deletion on chromosome 17p in advanced colorectal cancer. *Cancer* 1994 ; 73 : 28-35.