

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**BORDERLINE YÜZEY EPİTEL OVER
TÜMÖRLERİNDE MİTOKONDRIYAL
MİKROSATELLİT PROFİLİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gökhan GÖRGİŞEN

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2009

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**BORDERLINE YÜZEY EPİTEL OVER
TÜMÖRLERİNDE MİTOKONDRIYAL
MİKROSATELLİT PROFİLİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gökhan GÖRGİŞEN

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Özgül ALPER**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

(Proje no: 2008.02.0122.010)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir. / / 2009

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Özgül ALPER
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Güven LÜLECİ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Şeyda F. KARAVELİ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / tarih ve / kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Kanser, birçok genetik değişimlerin birikimi sonucunda oluşan bir hastalıktır. Bu genetik değişimlerin başında proto-onkogen, ve/veya tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, heterozigosite kaybı (LOH) ya da mikrosatellit kararsızlığını (MSI) etkileyen faktörler gelmektedir. Bu genetik değişimler sonucunda, hem nükleer hem de mitokondriyal genomda genomik instabilite (GI) oluşmaktadır. Genomik instabilitenin en iyi göstergesi ise mikrosatellit kararsızlığıdır.

Gelişmiş ülkelerde over kanseri, kadınlarda ölüme sebebiyet veren kanserler arasında beşinci sırada yer almaktadır. Over kanserine erken evrede tanı konması oldukça güçtür. Bu nedenle çoğu hastaya (%90) hastalığın ileri evresinde tanı konmakta ve beş yıllık yaşam sürelerinin %30' dan daha az olduğu belirtilmektedir.

Borderline over tümörleri, over neoplazilerinin %10-15' ini oluşturmaktadır. Düşük potansiyelli malign tümörler (LMP) olarak da adlandırılan bu grup, histopatolojik ve biyolojik özellikleri bakımından benign ve malign tümörler arasında geçiş özelliği göstermektedir. Bu nedenle epitel over tümörlerinin patogenezinin aydınlatılması açısından önem taşımaktadır.

Projemizin amacı LCM (lazer mikrodiseksiyon) sonucunda toplanan spesifik borderline yüzey epitel over tümör dokularında, jinekolojik kanserlerde değişimin sık gözlendiği D-loop bölgesinin 303, 514, 16184 ve 12S rRNA bölgesinde 956 nükleotit pozisyonlarındaki (np.) mikrosatellit bölgelerinde meydana gelen özgün değişimleri saptamaktır. Çalışmamızda seröz ya da müsinöz borderline tümör tanısı almış, 16 olgunun spesifik tümör ve normal dokusu ile spesifik 8 tümör ve 1 normal dokuda ilgili bölgelere yönelik dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Seröz borderline tümör grubundaki olguların %65' inde D-loop 303 bölgesinde [m.309_310insC(8), m.309_310insCC(1)], %32' sinde 514 bölgesinde [m.523_524insCA(6)], %14' ünde 12S rRNA geni 956 nükleotit pozisyonunda [m.961delTinsC(1)] mutasyonlar saptanmıştır. Müsinöz borderline tümör grubundaki olguların ise, %67' sinin D-loop 303 bölgesinde [m.309_310insC(15), m.309_310insCC(2), m.309_310insCCCC(1)], %37' sinin 514 bölgesinde [m.523_524insCA(8), m.522delCA(2)], %3' ünün 16184 bölgesinde [m.16189delTinsC] mutasyonları saptanmıştır. Seröz borderline olguların 16184 np. ve müsinöz borderline olguların 956 np.' da herhangi bir değişim saptanmamıştır.

Bugüne kadar spesifik borderline over tümörlerinde mitokondriyal genom çalışması bulunmamaktadır. Çalışmamız sonucunda ilk kez borderline tümör tanısı almış dokuların spesifik tümör ve normal hücre popülasyonlarında ilgili mikrosatellit bölgelere ait özgün değişimler ortaya konmuştur. Ayrıca elde ettiğimiz veriler, epiteliyal over tümörlerinin patogenezinde mitokondriyal genomun rolüne yönelik çalışmalara da destek sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Borderline epitel over tümörleri, mtDNA ve kanser, mitokondriyal mikrosatellit instabilizasyonu, mitokondriyal genom, LCM

ABSTRACT

Cancer is a disease consisted of the accumulation of genetic changes, such as activation of oncogenes, inactivation of tumor suppressor genes, loss of heterozygosity and microsatellite instability. All of these changes cause mitochondrial and nuclear genomic instability. Microsatellite instability is a major sign of the genomic instability.

In developed countries, cancer of the ovary is among the five leading sites for cancer mortality in women. Ovarian cancer is difficult to diagnose in its early stages. Thus, most of the patients (90%) is diagnosed at the advanced stages, and the survival rate in these patients are less than 30%.

Borderline ovarian tumors account for 10-15% of all ovarian tumors. Ovarian tumors of low malignant potential (LMP) exhibit histopathologic features and biologic behavior between benign and malign tumors. Consequently, borderline ovarian tumors is important for clarifying the pathogenesis of epithelial ovarian tumors.

The goal of our project, is to identify the unique changes in four microsatellite regions (303 np., 514 np., 16184 np. and 956 np.) which exhibited instability in common female cancers in pure cell population of borderline ovarian tumors and their matched normal tissues collected by laser capture microdissection. Four microsatellite regions were sequenced in a series of sixteen tumors and with their matched normal tissues, eight tumor tissues and one normal tissue which were diagnosed as mucinous and serous borderline tumors. We found mutations in D310 region 65% [m.309_310insC(8), m.309_310insCC(1)], 514 np. 32% [m.523_524insCA(6)] and 956 np. 14% [m.961delTinsC(1)] of the serous borderline tumors group. Furthermore, for the mucinous borderline tumors group the mutation rate in detected as 67% for [m.309_310insC(15), m.309_310insCC(2), m.309_310insCCCC(1)], 37% for 514 np. [m.523_524insCA(8), m.522delCA(2)] and 3% [m.16189delTinsC] for 16184 np. We did not detect any genomic changes in 16184 np. of the serous borderline tumors group and 956 np. of the mucinous borderline tumors group.

Up to date, there is not any research about the microsatellite regions in the pure cell populations of tumor and normal tissues in the borderline ovarian tumors. Besides, our data will support the mitochondrial genome studies in the field of pathogenesis of epithelial ovarian tumors.

Key words: Borderline epithelial ovarian tumors, mtDNA and cancer, mitochondrial microsatellite instability, mitochondrial genome, LCM

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim, tez konumun seçimi, çalışmaları ve yazımı aşamasında emeğini, desteğini ve özverisini esirgemeyerek, akademik hayatımın ilk basamağında bilimsel bakış açısı kazanabilmem için gösterdiği çaba nedeniyle Sayın danışman hocam Doç. Dr. Özgül ALPER' e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgi ve hoşgörüsünü eksik etmeyerek, bilgi ve deneyimleriyle destek sağlayan Sayın Prof. Dr. Güven LÜLECİ' ye

Bu tezin gerçekleştirilmesinde ve çalışmalarımı tamamlayabilmem için gerekli olguları sağladıkları için Prof. Dr. Şeyda KARAVELİ' ye, Doç. Dr. Elif PEŞTERELİ' ye, Doç. Dr. Tayup ŞİMŞEK' e ve Yrd. Doç. Dr. Gülgün ERDOĞAN' a,

Yüksek lisans eğitimime başlamam ve devam ettirebilmem için gerekli maddi desteği sağlayan TÜBİTAK' a,

Benden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı' ndaki tüm hocalarıma, araştırma görevlisi ve teknisyen arkadaşlarım ve sekreterlerimize,

Hayatımın her aşamasında verdikleri desteği, emeği, güveni, anlayışları ve her zaman yanımda hissettiğim sevgileri için başta sevgili aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
2.1. Çalışmaya alınan mikrosatellit bölgeleri	6
2.2. Orijin aldığı dokuya göre over tümörlerinin sınıflandırılması	8
3.1. Çalışmamızda izlenen işlemler şeması	18
4.1. Tümör ve normal dokulardan elde edilen LCM görüntüleri	24
4.2. İlgili amplikonların jel görüntüleri	25
4.3. 303 np. mikrosatellit bölgesi referans dizisi	26
4.4. 514 np. mikrosatellit bölgesi referans dizisi	26
4.5. 956 np. mikrosatellit bölgesi referans dizisi	26
4.6. 16184 np. mikrosatellit bölgesi referans dizisi	26
4.7. Seröz borderline tümör tanılı olguların normal/tümör çiftlerinde dizi elektroferogram örnekleri	28
4.8. Müsinöz borderline tümör tanılı olguların normal/tümör çiftlerinde dizi elektroferogram örnekleri	31
4.9. Müsinöz borderline tümör tanılı olguların normal/tümör çiftlerinde dizi elektroferogram örnekleri	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No	Sayfa No
2.1. Mitokondriyal mikrosatellit dizilimleri	4
2.2. Mikrosatellit bölge değişimleri saptanan kanser türleri ve mutasyon oranları	5
2.3. WHO kriterlerine göre yüzey epiteliyal over tümörlerinin histolojik sınıflandırılması	10
4.1. Olguların klinik özellikleri	23
4.2. Borderline Seröz Epiteliyal Over Tümörü tanısı almış olguların normal-tümör dokularından elde edilen mitokondriyal genom değişimleri	27
4.3. Borderline Müsinöz Epiteliyal Over Tümörü tanısı almış olguların normal-tümör dokularından elde edilen mitokondriyal genom değişimleri	30

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Mitokondriyal Genom Yapısı	2
2.2. Kanserde Mitokondriyal Genom Değişimlerinin Önemi	2
2.2.1. Kanserde Mitokondriyal Genom Kararsızlığı	4
2.3. Over Kanseri	7
2.3.1. Over Tümörlerinin Sınıflandırılması	8
2.3.1.1. Tümörün Köken Aldığı Dokuya Göre Sınıflandırılması	8
2.3.1.2. Over Tümörlerinin Evrelendirilmesi	8
2.4. Epitelial Over Tümörleri	8
2.4.1. Over Yüzey Epitelinin Yapısı	8
2.4.2. Yüzey Epitel Over Tümörlerinin Sınıflandırılması	9
2.5. Borderline Yüzey Epitelial Over Tümörleri	10
2.5.1. Borderline Seröz Epitelial Over Tümörleri	11
2.5.1.1. Patolojisi	11
2.5.1.2. Moleküler Genetik Değişimler	12
2.5.2. Borderline Müsinöz Epitelial Over Tümörleri	13
2.5.2.1. Patolojisi	13
2.5.2.2. Moleküler Genetik Değişimler	14
MATERYAL VE YÖNTEMLER	15
3.1. Periferik Kan Örneklerinin Alınımı	15
3.2. Periferik Kandan DNA Eldesi	15
3.2.1. Kullanılan Solüsyonlar	15
3.2.2. İşlemler	16
3.3. Doku Örneklerine Uygulanan İşlemler	17
3.4. DNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü	19
3.5. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi	19
3.5.1. PCR reaksiyon içeriği	19
3.5.2. PCR programı	20
3.6. Agaroz Jel Elektrophorezi ve Görüntüleme Sistemi	20
3.6.1. % 1.8'lik agaroz jelin hazırlanması	20
3.6.2. İşlemler	20
3.7. Amplikonların temizlenmesi	20

3.7.1.	İşlemler	20
3.8.	DNA Dizi Analizi	20
3.8.1.	Dizileme Reaksiyon İçeriği	21
3.8.2.	Dizileme PCR Programı	21
3.9.	Dizi Analizi Yapılacak Amplikonların Temizlenmesi	21
3.10.	DNA Dizi Analizi	21
BULGULAR		22
4.1.	Patolojik Bulgular	22
4.2.	Moleküler Genetik Analizler	24
4.2.1.	Lazer Mikrodiseksiyon	35
4.2.2.	Moleküler Genetik Analiz Sonuçları	
TARTIŞMA ve SONUÇLAR		33
KAYNAKLAR		37
ÖZGEÇMİŞ		43

SİMGELER ve KISALTMALAR

mtDNA	:Mitokondriyal deoksiribonükleik asit
gDNA	:Genomik DNA
MSI	:Mikrosatellit instabilizasyonu
SBT	:Seröz borderline tümörler
mtMSI	:Mitokondriyal mikrosatellit instabilizasyonu
GI	:Genomik instabilite
LCM	:Lazer mikrodiseksiyon
LOH	:Heterozigosite kaybı
ATP	:Adenozin trifosfat
rRNA	:Ribozomal ribonükleik asit
tRNA	:Taşıyıcı ribonükleik asit
CSB	:Korunmuş dizi blokları
TM	:Tümör doku
NL	:Normal doku
FIGO	:Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ml	:Mililitre
µl	:Mikrolitre
dH₂O	:Distile su
TBE	:Tris Borat EDTA
UV.	:Ultra viyole
rpm	:Dakikada dönüş sayısı
OD.	:Optik Dansite
SF	:Sulandırma Faktörü
bç	:Baz çifti
ng	:Nanogram
ü	:Ünite

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümeleri sonucunda oluşan multifaktöriyal genetik bir hastalıktır. Genetik değişimler sonucunda hücreler farklı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler kazanmaktadırlar (1). Bu özelliklerin başında apoptozise direnç ve solunum hasarı gelmektedir (2). Mitokondri, hücrenin enerjinin üretimi, serbest radikallerin oluşumu, yağ oksidasyonunda, üre döngüsünde ve apoptozisin düzenlenmesinde görevli organel olması nedeni ile mitokondriyal değişimler tüm kanserlerde önem taşımaktadır (3).

Günümüzde yapılan moleküler düzeydeki temel araştırmalarda mtDNA genomunda pek çok tümöral doku ve kanser hücre hatlarında somatik mutasyonlar saptanmıştır. Bundan dolayı nükleer genomda gerçekleştiği gibi mitokondriyal genomda da meydana gelebilecek genomik instabilitenin tümör gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmüştür (4). Jinekolojik kanserlerdeki (serviks, over, endometrium ve meme tümörlerinde) mitokondriyal mikrosatellit instabilitesine ait çalışmada özellikle, D-loop bölgesinin 303, 514, 16184 ve 12S rRNA bölgesinde 956 nükleotid pozisyonlarındaki mikrosatellit bölgelerindeki değişimlerin, primer tümörler açısından önem taşıdığı vurgulanmıştır (5).

Over kanseri, hastalarda ölüm oranı olarak kadınlarda beşinci sırada yer almaktadır (6). Yüzey epitel over tümörleri, over neoplazilerinin %90' lık kısmını oluşturmaktadırlar (7). Borderline over tümörleri, bütün epiteliyal over neoplazilerinin %10-15' ini oluşturmaktadır (8). Bu grup, histopatolojik ve biyolojik özellikleri bakımından benign ve malign tümörler arasında geçiş özelliği göstermesi sebebiyle patogenezin açıklanmasında önem taşımaktadır (9, 10). Günümüzde borderline over tümörlerinde LCM uygulanarak mitokondriyal mikrosatellit bölge değişimlerini irdeleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada borderline epitel over tümör tanısı almış 25 olgunun spesifik tümör ve normal dokularında LCM yöntemi kullanılarak elde edilen primer tümör hücrelerinden elde edilen mtDNA örneklerinde önem taşıdığı vurgulanan mitokondriyal mikrosatellit bölgelerine yönelik moleküler genetik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Spesifik borderline over tümör ve normal hücre topluluklarından elde edilecek mitokondriyal genoma ait veriler ile, tümörlerin ilgili bölgeye ait özgün genetik profilleri ortaya konacaktır. Araştırmamız, bu alanda yapılan ilk çalışma olmasının yanı sıra epitel over tümörlerinin mitokondriyal patogenezinin aydınlatmaya yönelik diğer çalışmalara da ek veriler sağlayacaktır.

GENEL BİLGİLER

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümeleri sonucunda oluşan multifaktöriyal genetik bir hastalıktır. Genetik değişimler sonucunda hücreler farklı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler kazanmaktadırlar (1). Bu özelliklerin başında apoptozise direnç ve solunum hasarı gelmektedir (2). Mitokondri, hücresel enerjinin üretimi, serbest radikallerin oluşumu, yağ oksidasyonunda, üre döngüsünde ve apoptozisin düzenlenmesinde görevli organel olması nedeni ile mitokondriyal değişimler tüm kanserlerde önem taşımaktadır (3). Memeli hücreleri enerji gereksinime bağlı olarak ortalama 1000' in üzerinde mitokondriye , 10000' in üzerinde de mitokondriyal DNA kopyasına sahiptirler (11, 12).

2.1. Mitokondriyal Genom Yapısı

Mitokondri, evrimsel açıdan korunmuş, bir çok hayvan ve metazoanda gen içeriği ile boyutu aynı, ancak genlerin organizasyonu açısından farklı olan bir genomu sahiptir (3). Mitokondriyal genom, 16.569 baz çiftinden oluşan, halkasal ve çift sarmal bir yapıdadır (13). Sarmaldaki zincirlerden bir tanesi pürinlerin yoğun olması nedeni ile ağır zincir (H zincir) diğeri ise pirimidinleri yoğun olmasından dolayı hafif zincir (L zincir) olarak adlandırılmaktadır (14). Her bir mitokondri genomu, oksidatif fosforilasyon sisteminde görevli 13 polipeptit, mitokondride protein sentezinden sorumlu 22 tRNA ve 2 rRNA molekülü olmak üzere toplam 37 geni kodlamaktadır (15). Mitokondriyal genomda genler arasında intronik bölge bulunmamakla beraber, iki kodlanmayan bölge mevcuttur. Bu bölgeler mitokondriyal genomun replikasyon ve transkripsiyon orijini olan 1122 baz uzunluğundaki D-loop bölgesi ve yaklaşık 30 bazlık bir bölgeye sahip olan hafif zincirin replikasyon başlangıç noktasıdır (16). Nüklear genomda olduğu gibi mitokondriyal genomda da mikrosatellit dizileri yer almaktadır. Mitokondriyal genomda, genomun %0,7' lik kısmını oluşturan 12 mikrosatellit bölge bulunmaktadır. Bunlardan 3 tanesi D-loop bölgesinde, 6 tanesi NADH (nikotinamid dinükleotit dehidrogenaz) komplekslerinde, birer tane olmak üzere de 12S rRNA, ATP sentaz 6 ve sitokrom C oksidaz 1 geninde lokalizedir. (Çizelge 2.1) (4, 5). Oksidatif fosforilasyon ile ilişkili diğer polipeptidler ise nüklear genom tarafından kodlanmaktadır (4).

2.2. Kanserde Mitokondriyal Genom Değişimlerinin Önemi

Mitokondri genomu, histonların bulunmayışı, tamir mekanizmasının yetersizliği, oksidatif stresin oldukça yoğun olması ve toksik kimyasal birikimine yatkınlığı nedeni ile mutasyonlara oldukça açık bir yapıya sahiptir (17, 18). Son yıllarda yapılan araştırmalarda da mitokondriyal mutasyonlar, mitokondriyal

bozukluklar ve apoptozis kontrolünün bozulması ile kanserin de içinde bulunduğu pek çok hastalık arasında yakın ilişki olduğu gösterilmiştir (6). Halen kanserin prognozu ve ilerlemesi sırasında mitokondriyal proteinlerin ifadesinde, yapısında meydana gelen özgün değişimler hakkındaki bilgiler sınırlı ve araştırmaya açık bir alandır.

Günümüzde yapılan moleküler düzeydeki temel araştırmalarda, pek çok tümöral doku ve kanser hücre hatlarında mitokondriyal genomda somatik mutasyonlar saptanmıştır (19). Bunun yanı sıra, mitokondrinin apoptozisdeki görevi nedeniyle de kanser alanındaki araştırmalar mitokondriyal genom üzerinde yoğunlaşmıştır (20).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda D-loop, kanser açısından mutasyonların en sık gözlendiği bölge olarak belirtilmiştir (19, 21, 22). Kanser olgularındaki nokta mutasyonları D-loop bölgesinde yoğunlaşmaktadır. D-loop bölgesinde, 16024-16383 nükleotit pozisyonu (np.) ile 57-372 np. arasında kalan bölgeler değişken bölgeler olarak tanımlanıp adli tıp ve hastalıkların tanısında kullanılmaktadır (23). Bu bölgede saptanan değişimlerin hücrel DNA hasarı ve kanser gelişiminde bir belirteç olabileceği belirtilmektedir (24).

Kanser hücrelerinde, D-loop değişimlerinin yanında diğer mitokondriyal genlerde de değişimler saptanmıştır. Örneğin; renal karsinom için mtDNA'da NADH dehidrogenaz altünite III geninin kaybı ve COX I (sitokrom oksidaz I) geninde meydana gelen 40 bp (baz çifti) uzunluğundaki insersiyon, spesifik değişimler olarak belirtilmiştir (11). Liu ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan çalışmada, over tümörlerinde D-loop bölgesinin dışında 12S rRNA ve 16S rRNA genlerinde de değişimler saptanmıştır. Bu değişimlerin tümör gelişiminde önemli olabileceği düşünülmektedir (25).

D-loop, mtDNA' nın replikasyon ve transkripsiyon orijini olmasının yanında genomun mitokondri membranına bağlı olduğu bölgede bulunarak lipid peroksidazlara yoğun bir şekilde maruz kalması ve replikasyon sırasında bu bölgede oluşan üçlü zincir yapısının oksidatif strese oldukça hassas olması bölgenin mutasyon oranını oldukça arttırmaktadır (4). Lee ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan çalışmada bu bölgede meydana gelen mutasyonların mitokondriyal genomun kopya sayısını ve gen ifadesini etkileyebileceği belirtilmiştir (11, 19, 21).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, pek çok kanser tipinde tanımlanan mutasyonların yanında mtDNA kopya sayısında da değişimlerin olduğu saptanmıştır (26). Baş ve boyun, tiroid, endometrium kanserlerinde mtDNA kopya sayısında artış saptanırken, meme kanseri olgularında kopya sayısında azalışın olduğunu gözlenmiştir (11, 27). Over kanseri gelişimi ile mtDNA içeriğinin ilişkisini ortaya çıkarmak amacıyla 2006 yılında Wang ve arkadaşları tarafından 38 primer over tümörü ve 4 borderline over tümörü üzerinde yapılan çalışmada, tümörlerde mitokondriyal DNA içeriğinin eşdeğer normaline kıyasla azalma gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca çalışmada borderline tümörler ile de ilişki kurularak mtDNA

içeriğinin invaziv karsinomdan farklı olmadığı ve histolojik sınıflamada da anlamlı bir değişimin olmadığı belirtilmiştir (28).

Bu değişikliklerin belirlenmesi ve tanımlanması, genotipik biyomarker niteliği taşıyan verilerin elde edilebilmesi ve yeni tedavi metodlarının geliştirilmesinde önem taşımaktadır (29, 30).

2.2.1. Kanserde Mitokondriyal Genom Kararsızlığı

Nüklear genomdaki proto-onkogen, ve/veya tümör baskılayıcı genlerdeki değişimler, heterozigosite kaybı (LOH) ya da mikrosatellit instabilitesini (MSI) etkileyen faktörler bu mutasyonlara neden olarak genomik instabiliteyi (GI) oluşturmaktadır (31, 32). Nüklear genom kararsızlığı (NGI), bir veya daha çok yanlış eşleşme tamir genindeki mutasyonları ve epigenetik değişimleri kapsamaktadır (33). 1993 yılından bu yana yapılan moleküler araştırmalarda bir çok kalıtsal ve kendiliğinden oluşmuş kanser türlerinde bu tip değişimler gösterilmiştir (32). Bundan dolayı mitokondriyal genomda da meydana gelebilecek instabilitenin tümör gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmüştür (4). Ancak mtDNA' daki değişimler ve sorumlu olan mekanizma tam olarak aydınlatılmış değildir (5).

Genomik instabilitenin, en iyi göstergesi hem nüklear hem de mitokondriyal genomda olan mikrosatellit bölgelerin kararsızlığıdır (5). Günümüzde, her iki genom arasındaki iletişim üzerine yapılan çalışmalar artış göstermekle beraber özellikle tümör oluşum mekanizmasında iki genom arası etkileşim yolları üzerinde yoğun istatistiki ve moleküler çalışmalar gelişen teknoloji ile devam etmektedir (12, 34).

Bilindiği gibi, mikrosatellit bölgeler, genellikle bir ile beş arasında değişen tekrar dizilerinden oluşmakta olup mitokondrideki mikrosatellit dizileri Çizelge 2.1 görülmektedir. Bu dizilerde tümör oluşumuna bağlı olarak insersiyon ve delesyonlar sonucunda normal dokuya kıyasla meydana gelen somatik mutasyonlar mikrosatellit instabilizasyonu olarak karşımıza çıkmaktadır (4, 35).

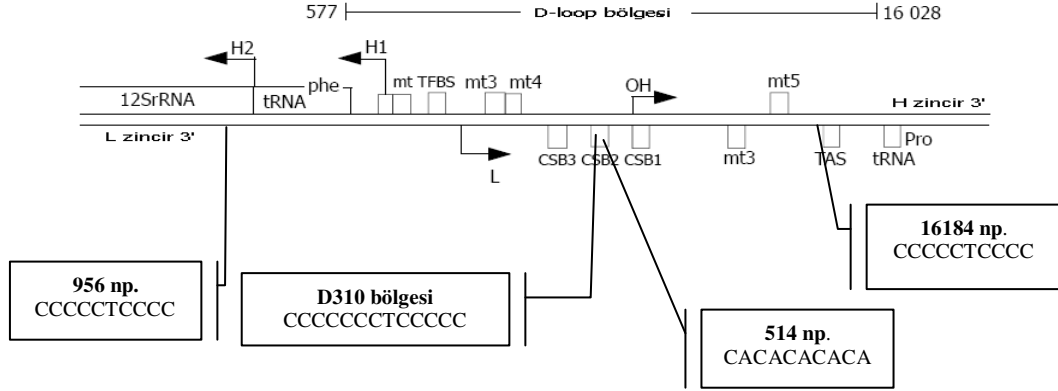
Çizelge 2.1. Mitokondriyal mikrosatellit dizilimleri (4)

Mikrosatellit dizisi	Dizi Pozisyonu	Bölge Adı
CCCCCCTCCCC	303-315	D-loop
(CA) ₅	514-523	D-loop
CCCCCTCCCC	956-965	12S rRNA
CCCCCCTCCCC	3566-3576	NADH dehidrogenaz 1
A ₇	4605-4611	NADH dehidrogenaz 2
A ₇	6692-6698	Sitokrom C oksidaz 1
T ₇	9478-9484	ATP Sentaz 6
C ₆	12385-12390	NADH dehidrogenaz 5
A ₈	12418-12425	NADH dehidrogenaz 5
(CCT) ₃ (AGC) ₃	12981-12998	NADH dehidrogenaz 5
A ₇	13231-13237	NADH dehidrogenaz 5
CCCCCTCCCC	16184-16193	D-loop

Hemen hemen tüm çalışılan kanserlerde D-loop bölgesindeki değişimlerin sık gözlemlenmesi ve burada meydana gelebilecek bir değişimin mitokondrinin kopya sayısı ile metabolik fonksiyonları açısından önem taşıdığının düşünülmesi nedeni ile mitokondriyal mikrosatellit instabilizasyonuna yönelik çalışmalar da bu bölge üzerine yoğunlaşmıştır (Çizelge 2.2)(32, 36). 2006 yılında Wang ve arkadaşları tarafından yapılan kadınlarda sık görülen kanserlerdeki (serviks, over, endometrium ve meme tümörlerinde) mitokondriyal mikrosatellit instabilitesine ait çalışmada özellikle, D-loop bölgesinin 303, 514, 16184 ve 12S rRNA bölgesinde 956 nükleotid pozisyonlarındaki mikrosatellit bölgelerindeki değişimlerin, primer tümörler açısından önem taşıdığı vurgulanmıştır (5). Bu çalışmada primer ve metastatik tümöral alanların analizinde servikal kanserli hastaların %25.4' ü, meme kanserli hastaların %29.4' ü, endometrium kanserli hastaların %48.4' ü ve over kanserli hastaların %21.9' unda bir veya birden fazla bölgede mtMSI instabiliteye rastlandığı belirtilmiştir (5).

Çizelge 2.2. Mikrosatellit bölge değişimleri saptanan kanser türleri ve mutasyon oranları

Mikrosatellit Bölgesi	Kanser tipi	Saptanan mutasyon oranları
D-loop 303 np	Mide kanseri	%62.5
	Kolorektal kanser	%38.6
	Safra kesesi kanseri	%38.2
	Serviks Kanseri	%35.7
	Hepatosellüler karsinom	%26.1
	Prostat kanseri	%25
	Mesane Kanseri	%22.6
	Meme Kanseri	%20
	Endometrium Kanseri	%32.3
	Özefagus Kanseri	%16
	Akciğer Kanseri	%16
	Glioblastoma	%11.8
	Tiroid Kanseri	%11.1
	Barrett Tümörleri	%10
	Astrokistoma	%10
	Over Kanseri	%17.9
D-loop 514 np	Meme Kanseri	%42.5
	Tiroid Kanseri	%25.4
	Mide kanseri	%15.6
	Glioblastoma	%5.9
	Over Kanseri	%6.4
	Serviks Kanseri	%2.8
	Endometrium Kanseri	%1.6
D-loop 16184 np	Glioblastoma	%23.5
	Astrokistoma	%10
	Prostat Kanseri	%9.4
	Meme Kanseri	%13.7
	Endometrium Kanseri	%14.5
12S r RNA 956np	Endometrium Kanseri	%6.5



Şekil 2.1. Çalışmaya alınan mikrosatellit bölgeleri (CSB: Korunmuş dizi blokları, OH: Ağır zincir replikasyon orijini, TAS: sonlandırma ilişkili dizi, mt3-4-5: kontrol elementleri, H1-2: transkripsiyon orijinleri)(37)

Mitokondriyal genomda, D-loop bölgesindeki tekrar dizileri arasında üzerinde en çok çalışılan bölgelerden biri D310 bölgesidir. D310 bölgesi, 303 np. başlayan ve timin (T) bazı ile kesintiye uğrayan sitozin (C) tekrarlarıdır. Bu bölgenin yabancıl motifi C_7TC_5 şeklindedir (38). D310, ağır zincirin replikasyon orijininin guanin (G) ve sitozin (C) nükleotitlerince zengin olan korunmuş dizi blokları II (CSBII)' de lokalizedir (Şekil 2.1)(35, 39). Korunan bu bölge, replikasyon sırasında RNA-DNA hibridini oluşturmakta ve yapının kararlılığına katkıda bulunmaktadır (40). Ancak, günümüze değin yapılan çalışmalarda meydana gelen kararsızlığın mtDNA replikasyonundaki etkisi tam olarak aydınlatılmış değildir (35).

2005 yılında Lee ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 54 hepatosellüler karsinom, 31 mide, 31 akciğer ve 25 kolorektal kanser olgularında özellikle D310 bölgesinde meydana gelen mutasyonların tümör oluşumunun ilerleyişine paralel olarak tümörün ileri evrelerinde artış gösterdiği ortaya konmuş ve bu bölgedeki kararsızlığın kanser oluşumunda rolünün olabileceği ileri sürülmüştür (21).

2006 yılında Kim ve arkadaşları tarafından yapılan kolorektal kanser olgularının epitel hücrelerinde saptanan mitokondriyal mikrosatellit değişimlerine ek olarak stromadaki mitokondriyal mikrosatellit değişimlerini irdeleyen çalışmada, tüm mikrosatellit bölgeleri arasında D310 bölgesi 'hot spot' olarak belirtilmektedir (41).

Yapılan bir diğer çalışmada ise, over tümörlerinin alt tiplerinde mitokondriyal DNA değişimlerini saptamak amacıyla yapılan çalışmada 16 erken evre seröz over tümör olgusu değerlendirilmiştir. Olguların % 81' inin D-loop bölgesinde TC insersiyonunun gerçekleştiği gözlemlenmiş ve değişimin epitelial over tümör oluşumu aşamasında gerçekleşen mikrosatellit instabilizasyonunun temel faktörü olabileceği belirtilmiştir (42).

Mitokondriyal genom boyunca ikili tekrar dizilerinden oluşan tek mikrosatellit bölgesi 514. np başlayan CA tekrarlarıdır (Çizelge 2.1) (35). Bu bölgede de yaygın olarak delesyon ve insersiyonlara rastlanmış ve tiroid, mide kanserleri, glioblastomalar ile ilişkilendirilmiştir (24, 35). Ayrıca, Yu ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada, kalıtsal meme kanseri olgularında 522 np. CA delesyonunun ve m.527C>G mutasyonuna sıklıkla rastlandığı belirtilmektedir (43).

Mitokondriyal mikrosatellit instabilitesinde en kararsız bölgelerin ikincisi 16184 np.'daki tekrar dizisidir. Tekrar dizisi, D310 bölgesi ile benzerlik göstermekte olup, yabancı motifi C₅TC₄ şeklindedir (38). Bu mikrosatellit bölgesi, D-loop' un çok değişkenli bölgesinde yer alan, 3' sonlandırma ilişkili dizinin sonunda ve 7S DNA bağlanma bölgesinde bulunmaktadır (35). Yapılan çalışmalarda, bu bölgedeki delesyon ve insersiyonlar ile germ line olarak aktarılan timin sitozin transisyonu arasında sıkı bir ilişkinin olduğu ve meydana gelen mutasyonların yüksek oranda mikrosatellit instabilizasyona neden olduğu belirtilmektedir (4). Bu bölgenin mtDNA genom replikasyonu ve mitokondriyal tek zincir DNA-bağlayıcı proteinler açısından önemli olduğu belirtilmektedir. Bu bölgede en sık değişim meme kanserli olgularda bulunmuştur. Bu yönde yapılan çalışmada olguların %47,5' inde instabilitenin varlığı belirtilmiş, meme kanseri gelişimine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (24). Ayrıca, endometrium kanseri ve tip II diyabet olgularında da oluşan polisitozin dizisinin metabolik risk faktörü olabileceği düşünülmüştür (5).

D-loop bölgesinin yanı sıra 12S ribozomal RNA' yı kodlayan bölgede 956 np. da, C₅TC₄ yabancı motife sahip mikrosatellit dizisindeki değişimler de mitokondriyal genom instabilitesine yol açmaktadır (38). Bu bölgede meydana gelen değişimlerin jinekolojik kanserler arasında endometrium kanseri için özgün olduğu belirtilmiştir (5). Tekrar dizisinde, en sık meydana gelen değişim, sitozin tekrarlarının ilk kısmında ve T>C transisyonu şeklinde olmaktadır (44). Bu şekilde oluşan homopolimerik sitozinler kararsızlığa sebep olmaktadır. Bu yönde endometrium kanseri üzerinde yapılan çalışmada %8 oranında değişimlerin meydana geldiği belirtilmiştir (44).

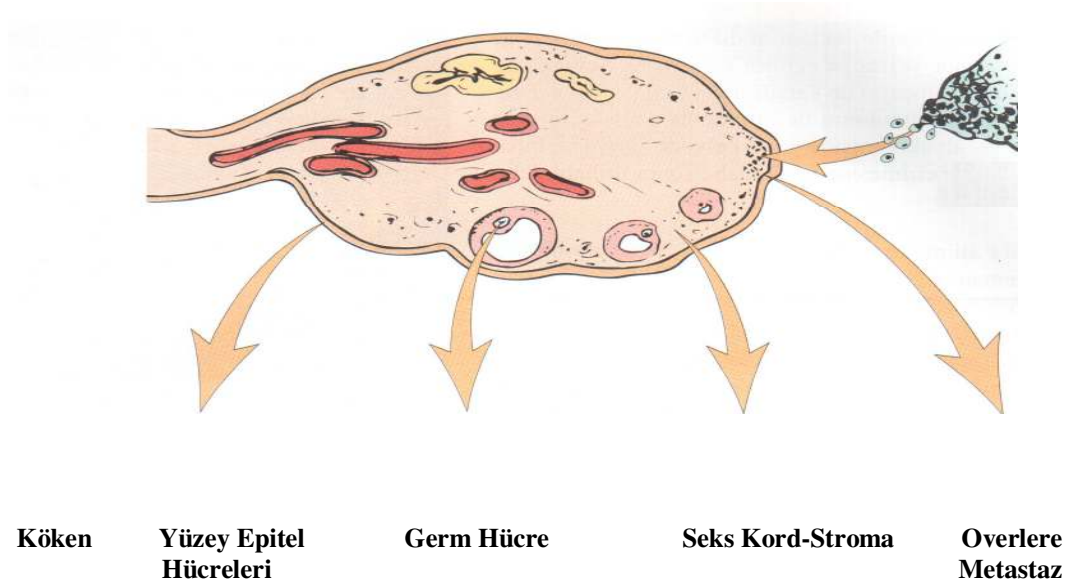
2.3. Over Kanseri

Gelişmiş ülkelerde, over kanseri, kadınlarda ölüme sebebiyet veren kanserler arasında beşinci sırada yer almaktadır (6). Over kanserine erken evrede tanı konulamamasının nedeni, görüntüleme sistemlerinin yetersizliği, abdominal bölgede şişliğin oluşması, şişlik hissi ve karın ağrısı gibi hastalığa spesifik olmayan semptomlarının bulunmasıdır (45). Bu sebeple çoğu hastaya (% 90) hastalığın ileri evresinde tanı konmakta ve beş yıllık sağkalım oranının % 30' dan daha az olduğu belirtilmektedir (6, 42). Erken evrede tanı konabilen hastaların aynı süreye ait sağkalım oranı % 80 olarak bildirilmiştir (46).

2.3.1. Over Tümörlerinin Sınıflandırılması

2.3.1.1. Tümörün Köken Aldığı Dokuya Göre Sınıflandırılması

Overler, embriyolojik dönemde farklı dokulardan köken alması nedeni ile farklı hücre gruplarını içinde bulundurmaktadır. Dolayısıyla over tümörleri de köken aldıkları dokuya göre Şekil 2.2’ de görüldüğü gibi üç temel gruba ayrılmaktadır.



Şekil 2.2. Orijin aldığı dokuya göre over tümörlerinin sınıflandırılması (7)

Yüzey epitel over tümörleri, yüzey epitelinden köken almaktadır. Malign tümörlerin %90’ lık kısmını oluşturmaktadırlar. Histolojik olarak oldukça heterojen bir grubu temsil etmektedirler. Bu grup tümörler genellikle 20 yaşın üzerindeki bireylerde gözlenmektedir (7).

2.3.1.2. Over Tümörlerinin Evrelendirmesi

Tüm over tümörlerinin evrelendirilmesi, FIGO (Uluslararası Jinekolojik ve Obstetrik Federasyonu) ve TNM’ e göre yapılmaktadır (47).

2.4. Epiteliyal Over Tümörleri

2.4.1. Over Yüzey Epitelinin Yapısı

Over yüzey epiteli, pelvik mezotelinden değişime uğrayarak overleri saran bir yapıdır. Bu yapı, çok az özellikle birbirinden ayrılan tek katlı yassı, küboidal ve silindirik epitelten oluşmuştur. Son yıllarda, over kanserlerinin artması ve olguların % 90’ ının yüzey epitel hücrelerindeki morfolojik değişimlerden kaynaklandığı düşüncesinin ortaya çıkması nedeni ile çalışmalar bu yapının orijini ve karsinogenezis aşamasındaki hem morfolojik hem de moleküler değişimleri üzerine yoğunlaşmıştır (48).

2.4.2. Yüzey Epitel Over Tümörlerinin Sınıflandırılması

Histolojik olarak tümörler, neoplastik değişim sonucunda benzerlik gösterdiği epitel hücre tipine göre seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücre, değişici hücreli, karışık tip, farklılaşmamış ve tanımlanamayan tümörler olarak sınıflandırılmaktadır (9, 49).

Histolojik sınıflamanın yanında tümörlerin davranışı göz önüne alınarak benign, borderline ve malign tümörler olmak üzere patolojik sınıflama yapılmaktadır. Histopatolojik sınıflama WHO (Dünya Sağlık Örgütü) kriterlerine göre yapılmaktadır (Çizelge2.3) (50).

Çizelge 2.3. WHO kriterlerine göre yüzey epiteliyal over tümörlerinin histolojik sınıflandırılması

1. Seröz tümörler

- (1) Malign
 - a. Adenokarsinom
 - b. Yüzey papiller adenokarsinom
 - c. Adenokarsinofibrom (malign adenofibrom)
- (2) Borderline
 - a. Papiller kistik tümör
 - b. Yüzey papiller tümör
 - c. Adenofibrom, kistadenofibrom
- (3) Benign
 - a. Kistadenom
 - b. Papiller kistadenom
 - c. Yüzey papilloma
 - d. Adenofibrom ve kistadenofibrom

2. Müsinöz tümörler

- (1) Malign
 - a. Adenokarsinom
 - b. Adenokarsinofibrom (malign adenofibrom)
- (2) Borderline
 - a. İntestinal tip
 - b. Endoservikal benzeri
- (3) Benign
 - a. Kistadenom
 - b. Adenofibrom ve kistadenofibrom
- (4) Mural nodül ile müsinöz kistik tümör
- (5) Psödomyxoma pertonei ile musinöz kistik tümör

3. Endometrioid tümörler

- (1) Malign
- (2) Borderline
- (3) Benign

4. Berrak hücre tümörleri

- (1) Malign
- (2) Borderline
- (3) Benign

5. Değişici hücreli tümörler

6. Yassı hücreli tümörler

7. Karışık epiteliyal tümörler

8. Farklılaşmamış karsinom

2.5.Borderline Yüzey Epiteliyal Over Tümörleri

Borderline over tümörleri histolojik ve klinik olarak 1929 yılında ilk kez Taylor ve arkadaşları tarafından “overin yarı malign tümörleri” olarak tanımlanmıştır (8, 51). Daha sonraki dönemlerde bu tümörler için “düşük dereceli invaziv olmayan karsinom”, “düşük malign potansiyelli tümörler” gibi tanımlamalar yapılmıştır (8, 52). 1971 yılında FIGO (The International Federation of Gynecology and Obstetrics), 1973 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından “Borderline, düşük malign potansiyelli tümörler” olarak sınıflamaya alınmıştır (52).

Borderline over tümörleri, bütün epiteliyal over neoplazilerinin %10-15' ini oluşturmaktadır (Çizelge2.3)(53).

Borderline over tümörleri kendi aralarında seröz, musinöz, endometrioid, berrak hücre, değişici ve karışık tip epiteliyal tümörler olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Ancak sınıflamada yaygınlıkları sebebiyle seröz ve musinöz borderline tümörler temel alınmaktadır (10, 51, 54).

Düşük potansiyelli malign tümörler (LPM) ya da borderline olarak da adlandırılan bu grup, histopatolojik ve biyolojik özellikleri bakımından benign ve malign tümörler arasında geçiş özelliği göstermektedir (50, 54).

Histolojik olarak borderline over tümörlerinde, epitelde geniş ve küçük papiller gelişim ile yalancı çok katlı tabakalanma, papillayı çevreleyen epitelde proliferasyon, mitotik aktivitede artış gözlenmekle beraber, malignden farklı olarak doku harabiyeti ve gerçek stromal invazyon bulunmamaktadır (8, 52).

Borderline over tümörleri, malign over tümörlerine göre daha genç yaşlarda görülmesinin yanı sıra prognozu da oldukça iyidir (55). Tümör over dışına yayılmamış ise tümöre bağlı ölüm olmayacağı ve yüksek evreli olgularda bile tanıdan sonra uzun bir yaşam süresi vardır. Borderline tümörler olgularından evre I' de tanı alan hastaların beş yıllık sağkalım sürelerinin % 99 oranında olduğu belirtilirken evrenin ilerlemesine bağlı olarak sağkalım oranının gittikçe düşüş gösterdiği belirtilmektedir (54).

Borderline tümör tanılı olgularda periton implantları gelişebilmektedir (52). Peritondaki implantlar benign ya da invaziv özellikte karşımıza çıkmaktadır (10). Genellikle borderline vakalarında mortalite bu tip over dışı yayılımı olan hastalar ile sınırlıdır. Ancak bu over dışı yayılımların ayırt edilmesi ve tedavisi konusunda hala tartışmalar sürmektedir (52, 56).

2.5.1. Borderline Seröz Epiteliyal Over Tümörleri

2.5.1.1. Patolojisi

Gelişmiş ülkelerde, seröz tümörler tüm over neoplazilerinin % 80-85' ini oluşturmaktadır (57). Seröz neoplazilerinin % 9-15' ini de borderline tümörler kapsamaktadır. Olguların ortalama yaşları 38 olup görüldüğü yaş aralığı 17-77' dir. FIGO sınıflamasına göre olguların, % 68' ini evre I, % 11' ini evre II, % 21' ini evre III ve % 1' lik kısmını da evre IV oluşturmaktadır. Seröz over tümörlerinde % 40 oranında bilaterite gözlenmektedir. Morfolojik olarak genellikle kistik ya da papiller yapıdadırlar. Dolayısıyla papiller seröz kistadenokarsinom ya da papiller kistadenomdan ayırt edilmesi güçtür (10).

Histolojik olarak, tipik borderline seröz tümör karmaşık ve hiyerarşik dallanmalar gösteren çok odaklı fibröz papiller yapılarıyla invazyon yapmayan proliferatif neoplaziler olarak adlandırılmaktadır. Papillalardan hücrelerin ayrılması ve dökülmesi karakteristik özelliği olarak belirtilmektedir (10, 58).

2.5.1.2. Moleküler Genetik Değişimler

Literatürde yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre nüklear genomda benign ve borderline tümörlerde kompleks kromozomal aberasyonlar görülmezken, invaziv over kanserlerinde kompleks kromozom aberasyonları saptanmıştır (erken lezyonlarda 3q26, 8q24, ve 20q13 duplikasyonları). 4, 13, 16, 18 ve X kromozomlarının parça kaybı tümör progresyonunu ve kötü prognozu göstermektedir. Ayrıca, hücre proliferasyonu ve apoptozisi regüle eden regülatör genler (*p16*, *siklin D1*, *Rb*, *p53*, *myc*, *bcl-2*) ve tirozin kinaz reseptörlerinde değişimler görülmektedir. (Her-2/neu, dab-2, K-ras, P13-K, PTEN) (8, 59, 60).

Borderline over tümörlerini ileri derece seröz tümörlerden ayıran diğer bir özellik ise p53 mutasyonlarının oldukça nadir gözlenmesidir. İleri derece seröz karsinomlarda bu mutasyonun görülme oranı % 61-67 olarak belirtilmiştir (61). Dolayısıyla tümör oluşum yolağında seröz borderline tümörler (SBT) için ileri derece seröz karsinomun öncülü demek yanlış olacaktır (9, 52, 58).

2005 yılında Shih İe ve arkadaşları tarafından SBT' lerden elde edilen moleküler genetik veriler, KRAS sinyal yolağına dikkat çekilmesi gerektiğini göstermektedir. KRAS ve mediyatörü olan BRAF mutasyonları bir çok tümör grubunda tanımlanmış mutasyonlardır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar RAS/RAF/MEK/MAPK sinyal yolağının sürekli aktivasyonuna sebep olmaktadır (52).

Bu iki gen ve SBT olgularını ilişkilendirmek amacıyla yapılan çalışmalarda KRAS' ın 12. ve 13. kodonundaki mutasyon ile BRAF' ın 600. kodonunda valinin glutamik asite değişimine sebep olan yanlış anlamlı mutasyona erken evre vakalarının yaklaşık üçte ikisinde rastlanmıştır. Buna karşın, ileri derece seröz karsinom vakalarında bu mutasyonlara rastlanmamıştır (58). Aynı zamanda araştırmacılar bu iki mutasyonun aynı vakada gözlenmesinin oldukça nadir olduğunu belirtmektedirler (9, 61).

Cheng ve arkadaşları tarafından 2004 yılında, 30 seröz kistadenom vakası üzerinde yapılan çalışmada, kistadenomlarda BRAF ve KRAS mutasyonlarının saptanmadığı ancak pozitif kontrol olarak kullandıkları borderline tümör olgusunda BRAF mutasyonuna rastlandığı belirtilmiştir (62).

Nükleer genoma bağılı olarak seröz over tümörlerinin moleküler patogenezi aydınlatmak amacıyla 8 borderline tümör odaklı kistadenom olgusunda lazer mikrodiseksiyon ile yapılan *KRAS* ve *BRAF* mutasyon analizi çalışmasında, borderline odaklarda ve öncülleri olan kistlerde % 88 oranında *KRAS* ve *BRAF* mutasyonları saptanmıştır (61). Buna bağılı olarak da bu mutasyonların borderline tümör gelişiminde önemli öncül olduklarını belirtmişlerdir (61).

Over tümörlerinde mitokondriyal genom üzerinde yapılan çalışmalar mevcuttur. 2007 yılında Aikionbare ve arkadaşları tarafından over tümörlerinin alt tiplerinde mitokondriyal genom değişimlerini saptamak amacıyla yapılan çalışmada seröz tümörlerin erken evresi olan 3 benign kistadenom, 4 borderline tümör ve 5 evre I tümör olgusunda 303 np. pozisyonunda instabilitenin gerçekleştiğı belirtilmiştir (42).

2.5.2. Borderline Müsinöz Epitelial Over Tümörleri

2.5.2.1. Patolojisi

Müsinöz over tümörleri, over neoplazilerinin %12 -15' ini oluşturmaktadır (63). Diğer hücre gruplarına oranla farklı klinik özellikleri bulunmaktadır. Müsinöz tümörlerin borderline ve malign grubu oldukça agresif özellik taşımakta ve sıklıkla gastrointestinal bölgeye metastaz göstermektedir (63). Müsinöz borderline tümör vakalarına seröz borderline tümörlere göre daha nadir rastlanmaktadır. Bu grup temel olarak; endoserviks benzeri ve intestinal tip olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (10).

Endoserviks benzeri tümörler, klinik ve patolojik olarak seröz borderline tümörlerle oldukça benzerlik göstermekte ve genellikle seröz borderline tümörler ile karışık halde bulunmaktadır. Bu tip borderline tümörler endometriozis ile yakından ilişkilidirler. Olguların oldukça düşük bir kısmını oluşturmaları nedeni ile çalışmalar daha yaygın görülen intestinal tip müsinöz borderline tümörler üzerine yoğunlaşmıştır (64).

İntestinal tip müsinöz borderline tümörlerin %80' nini oluşturmaktadır. Ortalama görülme yaşı 35' tir. Müsinöz borderline tümörler tipik olarak düz yüzeyle benign müsinöz kistadenoma benzer multistik yapılar üretmektedirler. Vakaların %90' ı unilateraldir. Bilateralitenin varlığı apendiks ya da gastrointestinal bölgeden overlere metastaz yapmış bir odağın varlığını düşündürmektedir (10).

2.5.2.2. Moleküler Genetik Değişimler

Seröz tümörlerden farklı olarak, müsinöz tümörlerin benign, borderline ve malign aşamalarında proto-onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ifade düzeylerinde ve mutasyon oranlarında yakın benzerlikler gözlenmiştir (63). Dolayısıyla borderline tümörlerin malign ile benign arasında geçiş aşamasını temsil ettiği düşünülmektedir (50).

Bugüne değin yapılan tüm çalışmalarda müsinöz tümörlerin patolojik ve histolojik alt gruplarında % 33 ile % 86 oranları arasında değişim gösteren *KRAS* mutasyonları saptanmıştır. *KRAS* mutasyonları müsinöz tümörlerin oluşumunda erken evrede oldukça önem taşımaktadır (64). Seröz tümörlerden farklı olarak müsinöz tümörlerde *BRAF* mutasyonlarına rastlanmamıştır (8, 52, 58).

2007 yılında Aikhionbare ve arkadaşları tarafından 17 müsinöz over tümörü olgusu üzerinde mtDNA değişimlerini saptamaya yönelik yapılan çalışmada, olguların tümünde tRNA^{val} geninde T1653A değişimi saptanırken, diğer mutasyonların 12s rRNA, ATP6 ve D-loop bölgesinde yoğunlaştığı bildirilmiştir (42).

Bugüne kadar seröz ve müsinöz over tümörlerinde lazer mikrodiseksiyon yöntemi ile toplanmış saf tümör hücreleri ve normal hücrelerin mtDNA mikrosatellit verilerinin karşılaştırıldığı bir çalışma mevcut değildir.

MATERYAL VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalına başvuran olgulardan cerrahi müdahale sonucunda Patoloji Anabilim Dalı tarafından Epitelial Borderline Over Tümör tanısı konan 25 olgu çalışma kapsamında değerlendirilmiş, bu olguların cerrahi müdahale sonunda tümöral doku örnekleri ile periferik kan örnekleri alınmıştır .

3.1. Periferik Kan Örneklerinin Alınımı

Yüzey Epitelial Borderline Over Tümör tanısı almış olgulardan 5ml. olacak şekilde periferik kan örnekleri K₃EDTA' lı steril tüplere (Venoject®) alındı. DNA izolasyon işlemine kadar +4 °C' de saklandı.

3.2. Periferik Kandan DNA Eldesi

Olguların genomik DNA'ları, periferik kandan modifiye non-enzimatik metod ile izole edildi. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler ve işlem basamakları aşağıdaki gibi uygulandı.

3.2.1. Kullanılan Solüsyonlar

CLB 1X (Hücre Liziz Tamponu)

0.32 M Sukroz	(Merck)
10mM Tris HCl pH 7.6	(Sigma)
5mM MgCl ₂	(Merck)
%1 Triton-X	(Sigma)

Yukarıdaki derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan CLB 1X tamponu otoklavda sterilize edildikten sonra +4 °C' de saklandı.

TKM1 (Düşük Konsantrasyonlu Tuz Solüsyonu)

10mM Tris HCl pH 7.6	(Sigma)
10mM KCl	(Reidel-de Haen)
10mM MgCl ₂	(Merck)
2 mM EDTA pH 8.0	(Sigma)

Yukarıdaki derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan TKM1 tamponu otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

TKM2 (Yüksek Konsantrasyonlu Tuz Solüsyonu)

10mM Tris HCl pH 7.6	(Sigma)
10mM KCl	(Reidel-de Haen)
10mM MgCl ₂	(Merck)
0.4mM NaCl	(Carlo Erba)
2 mM EDTA pH 8.0	(Sigma)

Yukarıdaki derişimleri sağlayacak şekilde distile su ile hazırlanan TKM2 tamponu otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

%10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Çözeltisi

1 gram SDS (Q-Bio gene) 10ml distile suda çözüldükten sonra filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

6 M NaCl (Sodyum Klorür)

35.06 gram NaCl (Carlo Erba) 100 ml distile suda çözülerek otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

%70'lik Etanol (C₂H₅OH)

70 ml %99 luk etanol, 30 ml distile su ile karıştırıldı ve +4 °C' de saklandı.

3.2.2. İşlemler

K3EDTA'lı steril tüplere alınan kan alt üst edilerek homojenize edildi. Kan örneğinden 3 ml alınarak 15 ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 3 katı hacim kadar CLB 1X eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Oda sıcaklığında devir sayısı (rpm) dakikada 2200 olacak şekilde 10 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldı. Çökelti elle vurularak homojenize edildikten sonra üzerine 5 ml TKM1 solusyonundan eklendi. Vorteksde karıştırılarak homojenize edildikten sonra oda sıcaklığında 2200 rpmde 10 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldı. Çökelti elle vurularak homojenize edildikten sonra üzerine 1.5 ml TKM2 ve 100µl %10 SDS solüsyonlarından eklendi. Tüp alt üst edilerek karışması sağlandı. Çökelti tamamen homojenize olana kadar 65°C'de 30-60 dakika süreyle su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra tüpe 570 µl 6M'lık NaCl eklendi. Beyaz köpüklü bir görünüm elde edene kadar vorteksde karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2900 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Dökelti içinde 4.5 ml %99 etanol bulunan 15 ml'lik santrifüj tüpüne transfer edildi. Tüp alt üst edilerek DNA'nın kondanse olması sağlandı. Tüp 2900 rpm'de santrifüj edildi. Dökelti atıldı. Çökelti üzerine 5 ml %70'lik etanol ilave edilerek DNA'nın yıkanması sağlandı. Oda sıcaklığında 2900 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek dökelti atıldı. Tüp içerisinde çökelti halinde bulunan DNA 10-15 dakika kurutuldu. Üzerine 300µl Tris EDTA solüsyonu (Fluka) eklendi ve etüvde 37 °C'de 1 saat veya 4 °C'de gece boyu bırakılarak DNA'nın çözülmesi sağlandı. Çözünen DNA 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Elde edilen DNA örneklerinin

optik dansite ölçümleri spektrofotometre ile yapıldıktan sonra, konsantrasyonları 50 ng/μl olacak şekilde sulandırılıp uzun süreli -20 °C’de, kısa süreli +4 °C’de saklandı

3.3. Doku Örneklerine Uygulanan İşlemler

Epitelial borderline over tümörü tanısı alan olguların ameliyat materyallerinden geriye kalan dokuları rutin parafin bloklara aktararak, standart doku takibi yapıldı. Şekil 3.1’ de sunulduğu gibi, parafin bloklardan 5 μ’ luk kesitler alınarak lazer mikrodiseksiyon cihazında normal ve borderline tümör alanlarına ait hücre grupları toplandı (İşlem 1). Toplanan spesifik hücrelerden genomik DNA izolasyonu Qiagen mikrokit (Qiagen, USA) ile yapıldı (İşlem 2). Tümör ve normal doku örneklerine ait gDNA’ lar ilgili mikrosatellit bölgelere ait oligonükleotitlerle amplifikasyon sonucu ampliconları oluşturularak (İşlem 3) ardından dizi analizi yapıldı (İşlem 4).

İşlem 1. LCM cihazı ile spesifik hücre gruplarının toplanımı

A



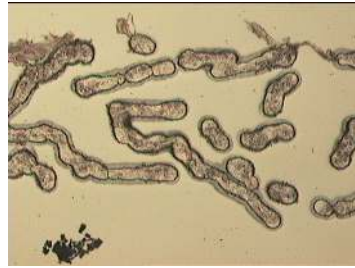
LCM öncesi doku kesiti

B



LCM sonrası doku kesiti

C

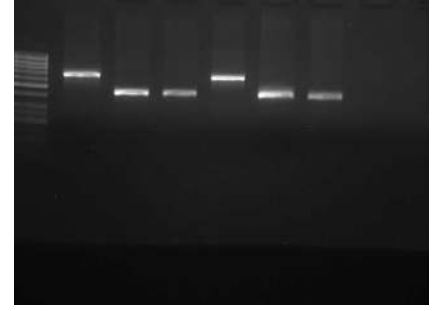


Başlıkta toplanan hücre grupları

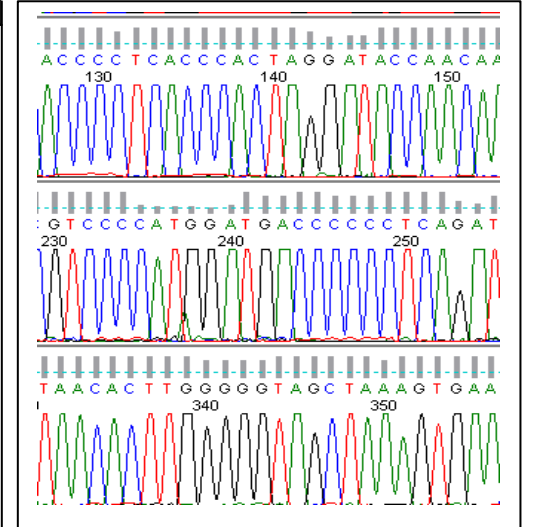
İşlem 2.

gDNA izolasyonu

İşlem 3. İlgili bölgelerin amplifikasyonu



İşlem 4. Amplikonların dizi analizi



Şekil 3.1. Çalışmamızda izlenen işlemler şeması

3.4. DNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü

İzole edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık derecelerini belirlemek için spektrofotometre ile ölçümler yapıldı. Optik dansite ölçülerini belirlemek amacıyla örnekler 1/200 oranında sulandırıldı. 5µl DNA örneği 995 µl dH₂O ile sulandırılarak 1000 µl'ye tamamlandı. Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında örneklerin ölçümü yapılarak DNA miktarları,

$$\text{DNA miktarı} = \text{Optik Dansite (O.D.)}(260 \text{ nm}) \times \text{Sulandırma Faktörü (S.F.)} \times 50$$

formülü ile hesaplandı. Hesaplanan değerlere göre DNA örnekleri 50ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.

3.5. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi

PCR reaksiyonu, Bio-Rad (MyCycler) ve PCR System 9700 (Gene Amp ®) marka thermal cyclerlarda gerçekleştirildi.

3.5.1 PCR reaksiyonu içeriği

PCR içeriği; dH₂O, 10X tampon (Fermentas), 25mM MgCl₂ (Fermentas), dNTP (10mM) Karışımı, İleri ve Geri primer (10µM), Taq DNA polimeraz (5ü/µl) (Fermentas) ve genomik DNA (50ng/µl) konularak 20 µl olacak şekilde hazırlandı.

D-loop 303 ve 514 nükleotid pozisyonlarına ait primer dizileri

İleri primer: 5' TATCGCACCTACGTTCAATA 3' (20 mer; Tm: 56°C)

Geri primer: 5' AGGAGGTAAGCTACATAAAC 3' (20mer; Tm: 56°C)

D-loop 16184 nükleotid pozisyonuna ait primer dizileri

İleri primer: 5' ATTACTGCCAGCCACCAT 3' (18 mer; Tm: 54°C)

Geri primer: 5' CGTGTGGGCTATTTAGGC 3' (18 mer; Tm: 56°C)

12S rRNA bölgesi 958 nükleotid pozisyonuna ait primer dizileri

İleri primer: 5' CAATGCAGCTCAAAACGC 3' (18 mer; Tm: 54 °C)

Geri primer: 5' ATCCACCTTCGACCCTTA 3' (18mer; Tm: 54 °C)

3.5.2. PCR programı

Başlangıç denatürasyonu, 95°C’ de 8 dakika; denatürasyon 95°C’ de 45 saniye, birleşme 55°C’de 45 saniye, uzama 72°C’ de 45 saniye olacak şekilde 35 döngü; son uzama ise 72°C’de 5 dakika olarak ayarlandı.

3.6. Agaroze Jel Elektroforezi ve Görüntüleme Sistemi

3.6.1. % 1.8’lik agaroz jelin hazırlanması

1.8 gram agaroz (Sigma) tartılarak 100 ml 1XTBE tamponu içinde (Tris-Borat-EDTA) (Dr. Zeydanlı) çözüldü. 50-55 °C’ye gelene kadar soğutuldu. 0.5 µg/ml etidyum bromür ilave edildi. Elektroforez küvetine taraklar yerleştirilerek sıvı agaroz jel elektroforez küvetine döküldü. Oda sıcaklığında 15-20 dakika polimerize olması için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra taraklar jelden alındı ve agaroz jel, elektroforez tankına yerleştirildi.

3.6.2. İşlemler

%1.8’lik agaroz jel, içerisinde 1XTBE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünü ve 50bp’lik marker yükleme tamponu kullanılarak kuyucuklara mikropipet yardımıyla yüklendi. Elektroforez tankına bağlı güç kaynağı ile 120 voltta 30 dakika yürütüldü. Süre sonunda örnekler UV ışık veren transilluminatör Syngene (İngenius) yardımıyla incelendi.

3.7. Amplikonların temizlenmesi

Amplifikasyon ürünlerinin temizlenmesi, PCR ürün pürifikasyon kiti (Roche) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.7.1. İşlemler

PCR ürünü steril distile su eklenerek 100 µl’ye tamamlandı. Üzerine 500 µl bağlama tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı. Karışım pürifikasyon filtresinin üzerine boşaltıldı. Oda sıcaklığında 14000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi. Tüpün dibine biriken dökelti atıldı. Pürifikasyon filtresinin üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 13000rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldı. İkinci yıkama 200 µl yıkama solüsyonu ile yapıldı. Tekrar oda sıcaklığında 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi ve dökelti atıldı. Pürifikasyon filtresi temiz 1.5 ml’lik ependorf tüpe aktarıldı. Üzerine 50 µl elüsyon solüsyonu ilave edildi. Oda sıcaklığında 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. DNA agaroz jelde kontrol edildi.

3.8. DNA Dizi Analizi

Dizi analizi reaksiyonları PCR System 9700 (Gene Amp ®) marka Thermal Cycler kullanılarak aşağıdaki programa göre yapıldı.

3.8.1. Dizileme Reaksiyonu

5X Tampon, Big Dye v3.1, primer (10µM), kalıp DNA ve H₂O konularak final hacmi 10µl olacak şekilde hazırlandı.

3.8.2. Dizileme PCR Programı

Denatürasyon, 96°C’de 10 saniye; birleşme, 50°C’de 5 saniye, uzama, 60°C’de 4 dakika ve 25 döngü olacak şekilde ayarlandı.

3.9. Dizi Analizi Yapılacak Amplikonların Temizlenmesi

Hazırlanan yeni 1.5 ml’lik ependorf tüplere 2µl 3.2M sodyum asetat (Mallinckrodt) (pH:4.6) konuldu. Üzerine 30µl %99 soğuk etanol ilave edildi. Bu karışımın üzerine amplifikasyon ürününün tamamı eklendi ve vortekste karıştırıldı. 20 dakika buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda oda sıcaklığında 14000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Pipetle dökelti alınarak atıldı. Çökelti üzerine 250µl %70 etanol ilave edildi. Oda sıcaklığında 14000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Tekrar dökelti pipetle alınarak atıldı. Tüplerin 10-15 dakika karanlıkta kuruması beklendi. Tüpler kuruduktan sonra üzerine 25µl formamid ilave edildi. Tüpler hafifçe vurularak karıştırıldı ve dizi analizi tüplerine aktarıldı. ABI 3130 dizileme cihazına konulmadan önce örnekler 94 °C’de 5 dakika denatüre edilerek cihaza yüklendi.

3.10. DNA Dizi Analizi

Denatüre edilen PCR ürünleri ABI 3130 dizileme cihazına yüklenerek sonuçlar ABI sequence analysis v3.1 yazılım programında değerlendirildi.

BULGULAR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından borderline yüzey epitel over tümörü tanısı konmuş 25 olgu değerlendirilerek aydınlatılmış onam formları alındıktan sonra çalışma kapsamına alınmıştır. (Etik Kurul Önonayı Sayı:346 Tarih: 18.08.08)

4.1. Patolojik Bulgular

Çalışma kapsamına alınan olguların yaş ve patolojik tanıları Çizelge 4.1' de sunulmuştur.

Borderline yüzey epitel over tümörü tanılı olguların yaş ortalamaları 41 olarak belirlenmiştir. Olguların 9' u seröz borderline tümör, 16' sı müsinöz borderline tümör tanısı almıştır. 18 olgunun FIGO/TNM değerlendirmesi bulunurken, 7 olgunun değerlendirmesi cerrahi nedenler ile bulunmamaktadır.

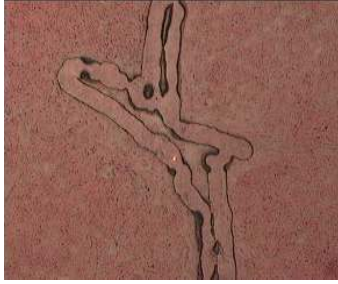
Çizelge 4.1. Olguların klinik özellikleri

Olgular	Yaş	Tanı	İmplant	FIGO	TNM
1	44	Borderline seröz kistadenom	(+)	IIA	pT2a pN0
2	36	Borderline müsinöz tümör	(-)	IA	pT1a pN0
3	53	Borderline seröz papiller kistik tümör	(-)	IC	pT1c pN0
4	43	Borderline müsinöz kistik tümör	(-)	IB	pT1b pN0
5	44	Borderline müsinöz tümör	(-)	IA	pT1a pN0
6	55	Borderline müsinöz tümör (intestinal tip)	(-)	IA	pT1a pN0
7	42	Borderline müsinöz tümör (endoservikal benzeri)	(-)	IA	pT1a pN0
8	43	Borderline müsinöz tümör (endoservikal benzeri)	(-)	IA	pT1a pN0
9	30	Borderline müsinöz tümör (endoservikal benzeri)			
10	38	Müsinöz borderline tümör (intestinal tip)	(-)	IA	pT1a pN0
11	20	Müsinöz borderline tümör	(+)	IIIA	pT3a pN0
12	47	Seröz borderline tümör	(+)	IIIC	pT3a pN1
13	6	Borderline müsinöz tümör			
14	34	Borderline seröz tümör			
15	60	Borderline seröz kistadenofibrom	(-)	IA	pT1a pN0
16	39	Borderline müsinöz tümör	(-)	IA	pT1a pN0
17	41	Borderline müsinöz tümör	(-)	IA	pT1a pN0
18		Borderline seröz papiller kistik tümör			
19	50	Borderline müsinöz adenofibrom (endoservikal benzeri)	(-)	IA	pT1a pN0
20	38	Seröz borderline tümör			
21	55	Borderline seröz tümör	(-)	IA	pT1a pN0
22	20	Borderline müsinöz tümör (intestinal tip)	(-)	IA	pT1a pN0
23	68	Borderline papiller seröz kist adenofibrom			
24	44	Borderline müsinöz tümör (endoservikal benzeri)	(-)	IA	pT1a N0
25	28	Borderline müsinöz tümör (intestinal tip)			

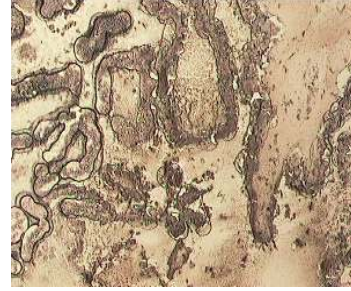
4.2.Moleküler Genetik Analizler

4.2.1. Lazer Mikrodiseksiyon (LCM)

Olguların, parafine gömülü normal ve tümör dokusu örneklerinden 5 μ kalınlığında kesitler alınarak lazer mikrodiseksiyon yöntemi ile hücreler toplandı. 5 μ parafin doku kesitlerinden LCM uygulama öncesi, sonrası ve başlıklarda toplanan hücre görüntülerine örnekler şekil 4.1' de sunulmuştur.



BO9-LCM Öncesi Normal Doku Kesiti



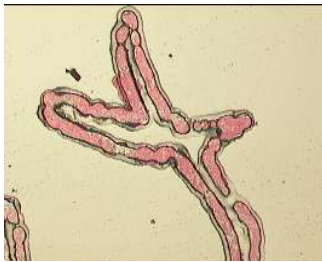
BO9-LCM Öncesi Tümör Doku Kesiti



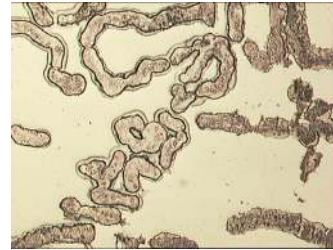
BO9-LCM Sonrası Normal Doku Kesiti



BO9-LCM Sonrası Tümör Doku Kesiti



BO9-Başlıkta Toplanan Normal Doku Kesiti

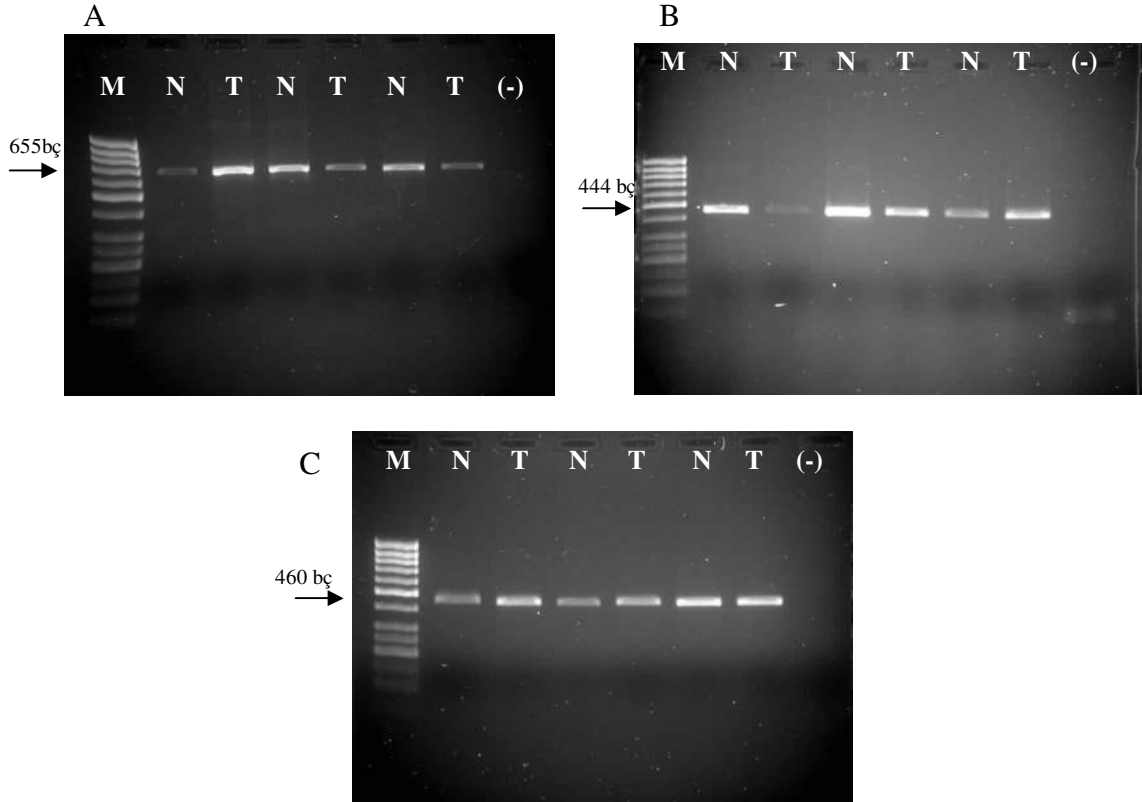


BO9-Başlıkta Toplanan Tümör Doku Kesiti

Şekil 4.1. Tümör ve normal dokulardan elde edilen örnek LCM görüntüleri

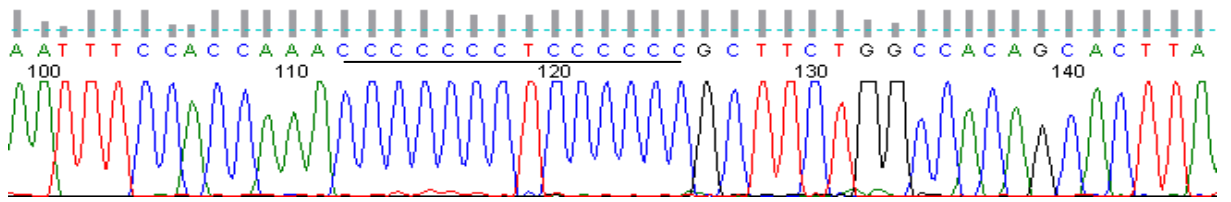
4.2.2. Moleküler Genetik Analiz Sonuçları

Borderline yüzey epiteliyal over tümör tanısı almış olgularda, mitokondriyal mikrosatellit profilinin değerlendirilmesi amacıyla D-loop bölgesinin 303 np., 514 np., 16184 np. ve 12S rRNA geninin 956 np.’ de bulunan tekrar dizilerine yönelik moleküler genetik çalışmalar yapılmıştır. Mikrosatellit dizileri, bu bölgelere ait özgün primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile çoğaltılmıştır. İlgili ampliconlar %1.8’ lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleri Şekil 4.1’ de sunulmuştur. PCR ile amplifiye edilen, 303 np ve 514 np. mikrosatellit bölgelerini içeren D-loop III bölgesinin amplicon büyüklüğü 460 baz çifti (bç), 16184 np. içeren D-loop I bölgesinin amplicon büyüklüğü 444 bç. ve 12S rRNA bölgesinin amplicon büyüklüğü 655 bç.’ dir.

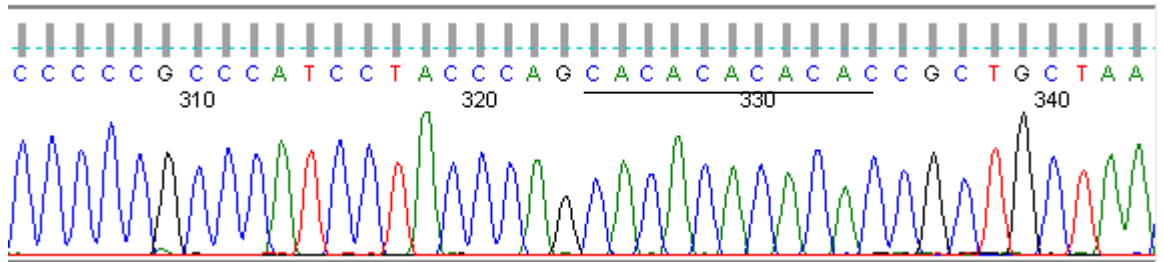


Şekil 4.2. İlgili ampliconların jel görüntüleri. A)12S rRNA geni – (956np)., B) D-loop I bölgesi- (16184 np.), C) D-loop 3 bölgesi- (303 np., 514np.) (M: Marker, N: Normal doku, T: Tümör doku, (-): Negatif kontrol)

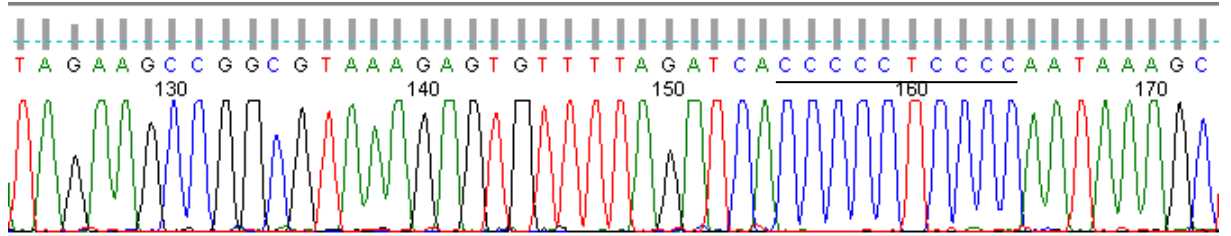
25 olgunun D-loop I, D-loop III ve 12S rRNA bölgelerinin amplifikasyon sonrası ampliconları, pürifiye edilerek DNA dizi analizine alınmıştır. Her mikrosatellit bölgesinin referans DNA dizisi şekil 4.3., 4.4., 4.5. ve 4.6’ da sunulmuştur.



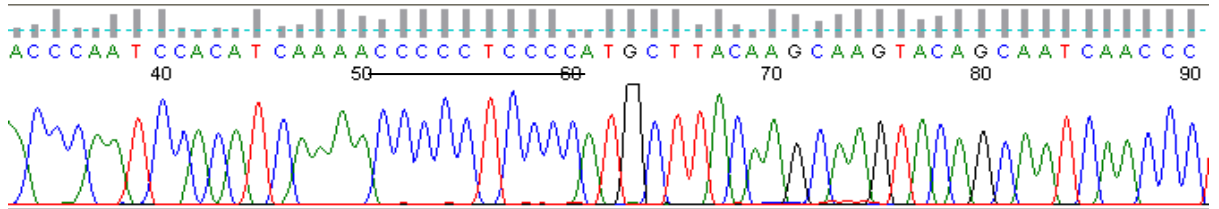
Şekil 4.3. 303 np. mikrosatellit bölgesi referans dizisi (D-loop 3 bölgesi – [C₇TC₆])



Şekil 4.4. 514 np. mikrosatellit bölgesi referans dizisi (D-loop 3 bölgesi – [CA]₅)



Şekil 4.5. 956 np. mikrosatellit bölgesi referans dizisi (12s rRNA geni- [C₅TC₄])



Şekil 4.6. 16184 np. mikrosatellit bölgesi referans dizisi (D-loop 1 bölgesi- [C₅TC₄])

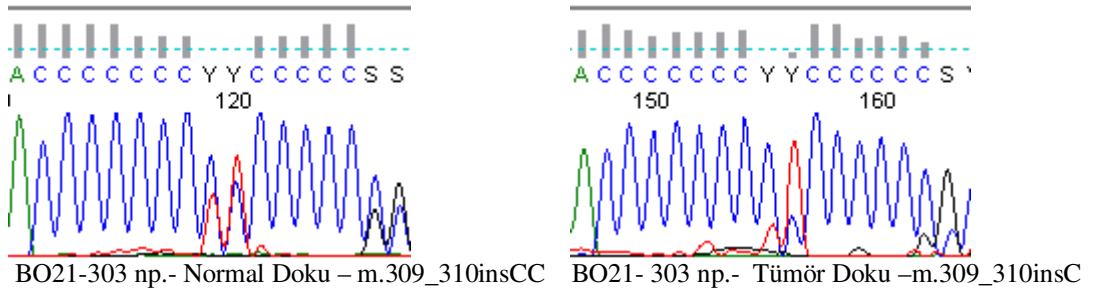
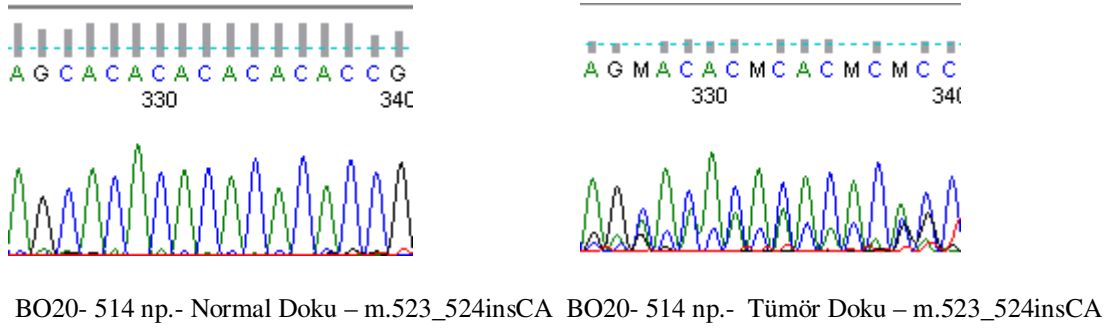
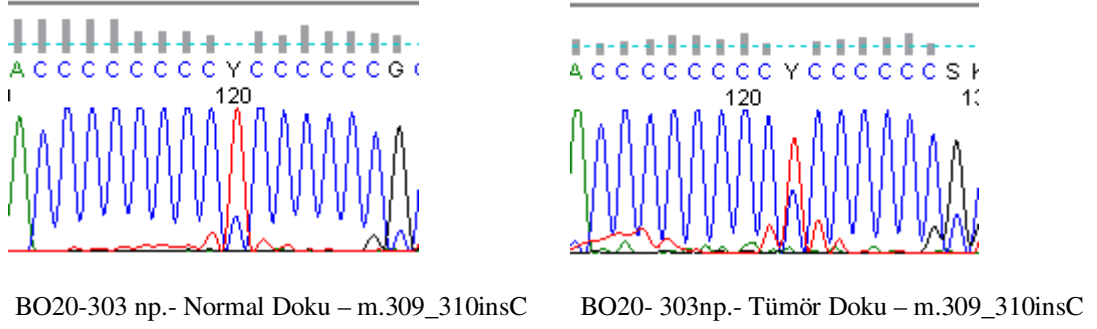
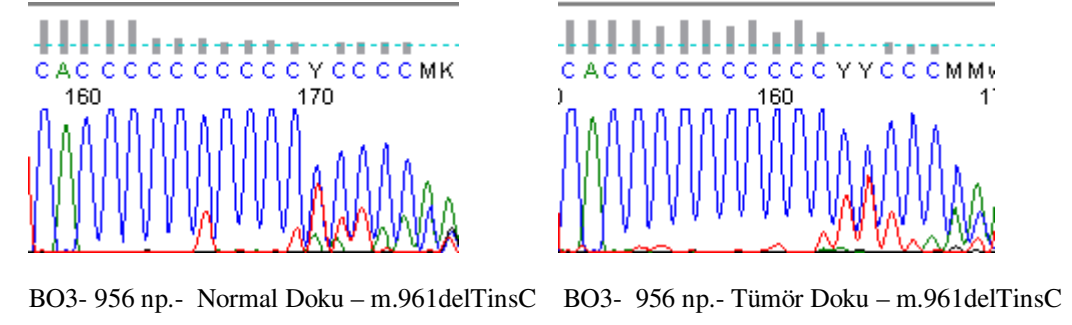
DNA dizi analizi sonucunda, çalışılan 16 olguya ait tümör ve normal doku çifti ile 8 tümör ve 1 normal dokuda farklı mikrosatellit bölgelerine ait değişimler saptanmıştır.

Borderline seröz tümör grubunda, 5 normal dokunun % 60 (3/5)' inin D310 bölgesinde mutasyonlar saptanmıştır. Bunlar m.309_310insC (n=2) ve m.309_310insCC (n=1) mutasyonlarıdır. Ayrıca normal dokuların, % 20 (1/5)' sinin 514 np. bölgesinde m.523_524insCA, % 20 (1/5)' sinin 956 np. bölgesinde m.961delTinsC mutasyonları saptanmıştır. Toplanan 9 seröz tümör dokusunun ise, % 67 (6/9)' sinin D310 bölgesinde m.309_310insC, % 56 (5/9)'sinin 514 np. bölgesinde m.523_524insCA, % 11 (1/9)'inin 956 np. bölgesinde m.961delTinsC mutasyonlarına rastlanmıştır. Seröz tümör ve normal dokularlarda 16184 np. bölgesinde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. (Çizelge 4.2.)

Seröz borderline tümör grubunda 5 olgunun tümör ve normal doku çiftlerinin değişimleri karşılaştırılmıştır. BO21 nolu olgunun D310 ve 514 np. bölgesinde somatik mutasyonlar saptanırken; BO12 ve BO20 nolu olguların D310 ve 514 np. bölgesinde, BO3 nolu olgunun ise 956 np. bölgesinde germ line mutasyon belirlenmiştir. Seröz borderline tümör tanılı olguların normal ve tümör çiftlerinde dizi elektroferogram örnekleri Şekil 4.7' de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Borderline Seröz Epitelial Over Tümörü tanısı almış olguların normal-tümör dokularından elde edilen mitokondriyal genom değişimleri

Olgu No	Doku	303 np. C ₇ TC ₅	514 np. (CA) ₅	956 np. C ₅ TC ₄	16184 np. C ₅ TC ₄
BO1	TM	C ₇ TC ₆	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO3	NL	C ₇ TC ₆	(CA) ₅	m.961delTinsC	C ₅ TC ₄
	TM	C ₇ TC ₆	(CA) ₅	m.961delTinsC	C ₅ TC ₄
BO12	NL	m.309_310insC	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	m.309_310insC	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO14	NL	C ₇ TC ₆	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	C ₇ TC ₆	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO15	TM	m.309_310insC	m.523_524insCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO18	TM	m.309_310insC	m.523_524insCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO20	NL	m.309_310insC	m.523_524insCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	m.309_310insC	m.523_524insCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO21	NL	m.309_310insCC	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	m.309_310insC	m.523_524insCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO23	TM	m.309_310insC	m.523_524insCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄



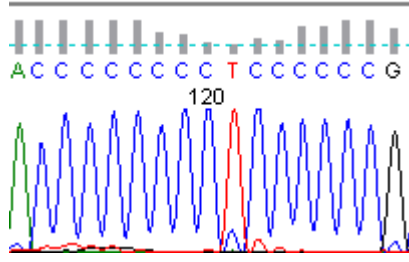
Şekil 4.7. Seröz borderline tümör tanılı olguların normal/tümör çiftlerinde dizi elektroferogram örnekleri

Borderline müsinöz tümör grubunda, 12 normal dokunun % 67 (8/12)'sinin D310 bölgesinde mutasyonlar saptanmıştır. Bunlar m.309_310insC (n=7) ve m.309_310insCC (n=1) mutasyonlarıdır. Ayrıca normal dokuların % 25 (3/12)'inin 514 np. bölgesinde m.523_524insCA mutasyonu saptanmıştır. 956 ve 16184 np. mikrosatellit bölgelerinde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Toplanan 15 borderline müsinöz tümör olgusunun ise, % 67 (10/15)'sinin D310 bölgesinde mutasyonlar saptanmıştır. Bunlar m.309_310insC (n=8), m.309_310insCC (n=1) ve m.309_310insCCCC (n=1) mutasyonlarıdır. Olguların % 44 (7/16)'sının 514 np. bölgesinde mutasyonlar saptanmıştır. Bunlar m.523_524insCA (n=5) ve m.522delCA (n=2) mutasyonlarıdır. Müsinöz tümör dokularının % 6 (1/16)'sının 16184 np. bölgesinde m.16189delTinsC mutasyonu saptanmıştır. Müsinöz tümör dokularının 956 np. bölgesinde mutasyon saptanmamıştır. (Çizelge 4.3.)

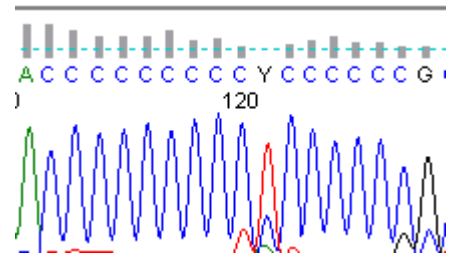
Müsinöz borderline tümör grubunda 11 olgunun normal ve tümör dokularındaki değişimler karşılaştırılmıştır. BO4, BO6, BO7, BO8, BO13, BO19 nolu olguların D310 bölgesinde, BO4, BO6, BO8, BO16, BO19, BO25 nolu olguların 514 np. bölgesinde ve BO5 nolu olgunun 16184 np. bölgesinde somatik mutasyonlar saptanırken, BO10, BO16, BO25 nolu olguların D310 bölgesinde, BO10 nolu olgunun 514 np. bölgesinde germline mutasyonlar belirlenmiştir. Müsinöz borderline tümör tanılı olguların normal ve tümör çiftlerinde dizi elektroferogram örnekleri Şekil 4.8 ve 4.9' da sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Borderline Müsinöz Epitelial Over Tümörü tanısı almış olguların normal-tümör dokularından elde edilen mitokondriyal genom değişimleri

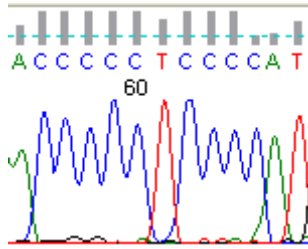
Olgu No	Doku	303 np. C ₇ TC ₅	514 np. (CA) ₅	956 np. C ₅ TC ₄	16184 np. C ₅ TC ₄
BO2	TM	m.309_310insC	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO4	NL	m.309_310insC.	m.523_524insCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	m.309_310insCC	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO5	NL	C ₇ TC ₆	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	C ₇ TC ₆	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	m.16189delTinsC
BO6	NL	m.309_310insCC.	m.523_524insCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	m.309_310insC	m.522delCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO7	NL	m.309_310insC	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	m.309_310insCCCC	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO8	NL	C ₇ TC ₆	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	m.309_310insC	m.523_524insCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO9	NL	C ₇ TC ₆	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	C ₇ TC ₆	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO10	NL	m.309_310insC	m.523_524insCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	m.309_310insC	m.523_524insCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO11	TM	C ₇ TC ₆	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO13	NL	m.309_310insC	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	C ₇ TC ₆	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO16	NL	m.309_310insC	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	m.309_310insC	m.522delCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO17	TM	m.309_310insC	m.523_524insCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO19	NL	C ₇ TC ₆	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	m.309_310insC	m.523_524insCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO22	TM	C ₇ TC ₆	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO24	NL	m.309_310insC	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
BO25	NL	m.309_310insC	(CA) ₅	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄
	TM	m.309_310insC	m.523_524insCA	C ₅ TC ₄	C ₅ TC ₄



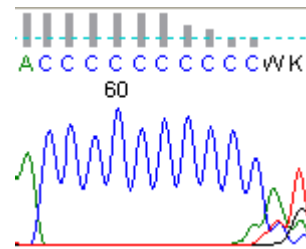
BO4- 303 np.- Normal Doku – m.309_310insC



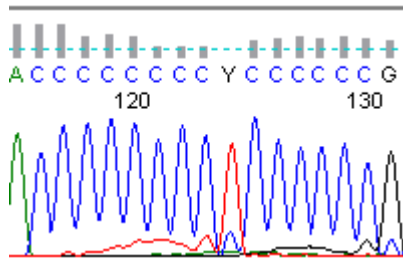
BO4- 303 np.- Tümör Doku – m.309_310insCC



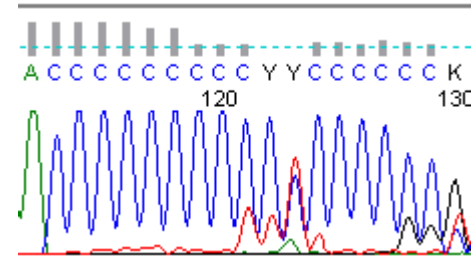
BO5- 16184 np.- Normal Doku – C₅TC₄



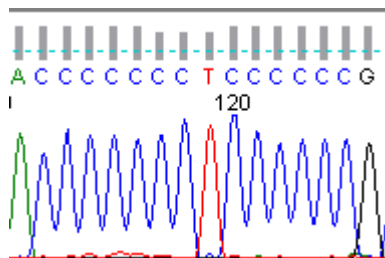
BO5- 16184 np.- Tümör Doku – m16189delTinsC



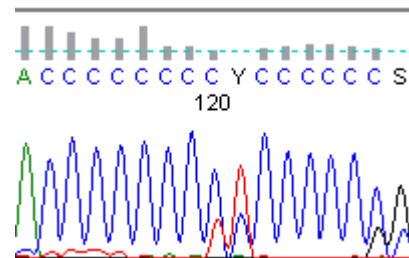
BO7- 303 np.- Normal Doku – m.309_310insC



BO7-303 np.- Tümör Doku – m.309_310insCCCC

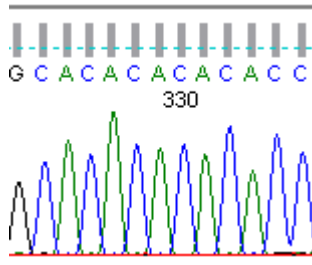


BO8- 303 np.- Normal Doku – C₇TC₆

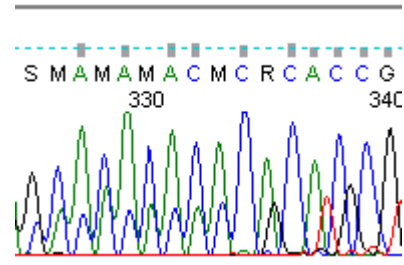


BO8- 303 np.- Tümör Doku – m.309_310insC

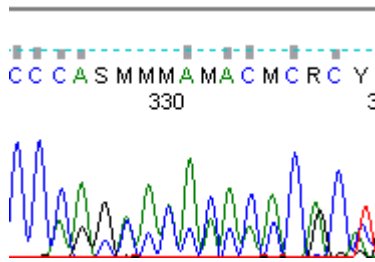
Şekil 4.8. Müsinöz borderline tümör tanılı olguların normal/tümör çiftlerinde dizi elektroferogram örnekleri



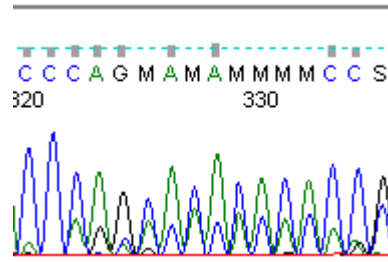
BO8- 514 np.- Normal Doku – (CA)₅



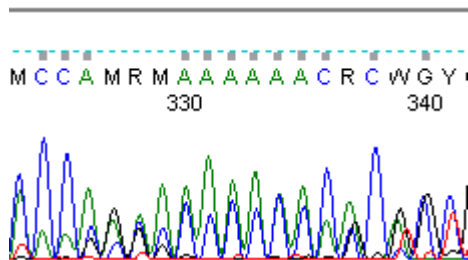
BO8- 514 np.- Tümör Doku - m.523_524insCA



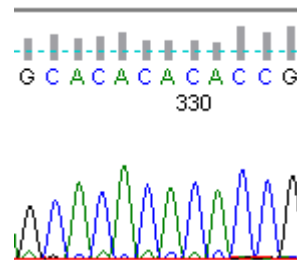
BO16- 514 np.- Normal Doku – (CA)₅



BO16- 514 np.- Tümör Doku – m.522delCA



BO6- 514 np.- Normal Doku – m.523_524insCA



BO6- 514 np.- Tümör Doku – m.522delCA

Şekil 4.9. Müsinöz borderline tümör tanılı olguların normal/tümör çiftlerinde dizi elektroferogram örnekleri

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Over kanseri, dünyada 5. ülkemizde ise 2005 yılı Sağlık Bakanlığı Kanser istatistikleri verilerine göre 7. sırada yer almaktadır. Bu sonuçlar önceki yıllara ait istatistikler ile karşılaştırıldığında over kanseri olgularının gittikçe artış gösterdiği gözlenmektedir (65).

Over neoplazilerinin % 90' ını epiteliyal over tümörleri oluşturmaktadır. Epiteliyal over kanserinin etiyolojisi ve patogenezi tam olarak bilinmemekle beraber tümörlerin orijini üzerine kurulmuş birbiriyle ilişkili hipotezler bulunmaktadır. Bu hipotezlerden bir tanesi over epitelinin ovulasyona bağlı olarak tekrarlayan travmalara maruz kalmasıdır (46). Bu durum toplam ovulasyon siklusu ve over kanseri gelişim riski arasındaki ilişki ile desteklenmektedir. İleri sürülen bir diğer hipotez tümör orjininin epitelin stromaya yaptığı invaginasyon sonucu oluşan inklüzyon kisti olduğuna yöneliktir (48). Bu durumda inklüzyon kistinin bulunduğu mikroçevrenin de neoplastik transformasyonda önem kazandığı bildirilmiştir (66). Over tümör gelişimine etkisi olan hormonal faktörler de tümörün etiyolojisinde önemli rol oynamaktadır (67). Over tümörlerinin patogenezinin bir çok faktöre dayandırılması sebebiyle tümör örneklerinde çalışmamızda uygulandığı gibi spesifik hücre populasyonları üzerinde yapılan araştırmalar bu alanda önemli veriler sağlamaktadır.

Borderline over tümörleri, epiteliyal over tümörlerinin % 10-15' lik kısmını oluşturmaktadır . Günümüze kadar yapılan çalışmalar halen kanserin tümüyle nasıl geliştiğine dair, özellikle moleküler patogeneze ait detaylı bir bilgi sağlamamaktadır. Bilindiği gibi kanserli hücrelerde, genomlarındaki değişim sonucu pek çok dolaylı ya da dolaysız olarak kendini gösteren özellik mevcuttur. Histopatolojik ve biyolojik özellikleri bakımından benign ve malign tümörler arasında geçiş özelliği göstermesi nedeni ile borderline over tümörleri, tümör gelişim yolağının aydınlatılması açısından önem taşımaktadır (50, 54).

Son yıllarda borderline over tümörlerinde nükleer genom üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda histopatolojik alt gruplara bağlı olarak, *BRAF*, *K-ras*, *PTEN*, *β katenin* mutasyonları ile mikrosatellit bölgelerinde kararsızlıklar saptanmıştır (58, 68).

2005 yılında Dana Farber Harvard Kanser merkezi tarafından yapılan çalışmada over kanserinin histolojik olarak çok heterojen bir hastalık olduğunu vurgulamışlardır (40). Dolayısıyla kanserde, mikrodiseksiyon ile spesifik hücre populasyonları üzerinde yapılacak çalışmalar farklı histolojik hücre tiplerindeki moleküler profilin ortaya çıkarılması açısından önem taşımaktadır.

Günümüze kadar borderline over tümörlerinde tek hücre klonal populasyonu ile nükleer genom değişimlerine yönelik çalışmalar bulunurken, mitokondriyal genom değişikliklerini irdeleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır (61, 69). Bugüne kadar yapılan borderline yüzey epitel over tümörleri ile mitokondriyal genom ilişkili

alışmalar bir tümör alanında bulunan değişik özelliklere sahip bazen de farklı tanıların olduğu alanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

2006 yılında Wang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, mikrodiseksiyon yapılmaksızın over tümörlerinde D310 bölgesinde % 19.2'sinde, 514 np. bölgesinde % 6.8' inde mutasyon saptanırken, 956 np. ve 16184 np.' nunda herhangi bir değişimin saptanmadığı belirtilmiştir (5). Ancak bugüne kadar spesifik borderline over tümör hücrelerinde mtDNA genom değişimlerinin belirtildiği bir veri halen mevcut değildir. Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz mutasyon analizi sonuçlarında, borderline seröz tümör dokularının % 67' sinde D310, % 56' sında 514 np., % 11' inde 956 np. bölgesinde değişim saptadık. Müsinöz borderline tümör dokularının ise % 67' sinde D310, % 44' nde 514 np. ve % 6' sında 16184 np. bölgesinde mutasyonlar belirledik. Bu değişimler spesifik borderline tümör hücre gruplarında 4 mikrosatellit bölgeye ait genetik profili ortaya koymaktadır. Dolayısı ile literatürde heterojen hücre popülasyonları üzerinde yapılan çalışmalar, tek hücre klonal popülasyonlarının genetik profillerinden farklı verilerin elde edilmesine sebep olmakta ve tmrigenezin genetik profili hakkında özgün bilgiler sağlanamamaktadır.

2006 yılında Kim ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, D310 bölgesinin kanserde “hot-spot” olduğu belirtilmiştir (41). Literatür ile uyumlu olarak çalışmamızda da en yüksek mutasyon oranı D310 bölgesinde saptandı. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda bu bölgede meydana gelen mutasyonların mitokondriyal genomun kopya sayısı ve gen ifadesini etkileyebileceği belirtilmiştir (11, 19, 21). Ayrıca, tümörlerde bu bölgede değişimlerin sık gözlemlenmesi nedeni ile hücresel DNA hasarı ve kanser gelişiminde de genotipik bir belirteç olabileceği belirtilmektedir (24).

2006 yılında Wang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 514 CA tekrar değişimlerini over tümörlerinde % 6.8 oranında saptanmış ve değişimi over tümörleri için nadir gözlenen bir değişim olarak belirtmişlerdir (5). Bu çalışmanın aksine 2007 yılında Aikhionbare ve arkadaşları tarafından epiteliyal over tümörlerinin alt tiplerinde ve evrelerinde mitokondriyal DNA' da meydana gelen değişimleri saptamaya yönelik yapılan çalışmada ilgili bölgedeki değişimlerin normal dokuya kıyasla anlamlı bir değişim olmadığı belirtilmiş ve mikrosatellit bölgesindeki değişimler çoğunlukla meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir. (42, 44). Ancak bu verilerden farklı olarak çalışmamızda, hem müsinöz hem de seröz gruplarda bu bölgede % 37 ve % 43 oranlarında değişimler saptadık. Bu mutasyonlar, m.522delCA(2) ve m.523_524insCA (14) değişimleridir.

Over tümörleri ve mtMSI (mitokondriyal mikrosatellit instabilizasyonu) zerinde yapılan çalışmalarda over tümörlerinde 956 ve 16184 np. mikrosatellit bölgelerinde bir değişim saptanmadığı belirtilmiştir (5). 12S rRNA bölgesinin 956 np. mikrosatellit bölge değişimi özellikle jinekolojik kanserler arasında endometrium kanseri için spesifik olabileceği ileri sürülmüştür (5). Bugüne kadar yapılan çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda olguların 16184 np. ve 956 np. bölgelerinde de değişimler saptadık. Bunlar 956 np. için seröz borderline tümör

grubunun BO3 nolu olguda saptanan germ line m.961delTinsC mutasyonu ile müsinöz borderline tümör grubunda BO5 nolu olgunun 16184 np. bölgesinde saptanan m.16189delTinsC somatik mutasyonudur. m.16189delTinsC değişiminin yarattığı uzun sitozin tekrarlarının instabilizasyonun artmasında temel rol oynadığı belirtilirken, değişim en sık meme kanseri olgularında saptanmaktadır (24).

Elde edilen veriler arasındaki temel farklılık çalışmaların heterojen doku örnekleri üzerinde yapılmasıdır. Buradan da anlaşılabileceği üzere kanserde, spesifik hücre popülasyonlarında yapılan mutasyon analizleri sonucunda elde edilen veriler gerçek tümör profilini ortaya çıkarmaktadır.

Heterojen tümör dokularında özellikle mitokondriyal genom mutasyon analizlerinde özgün değişimler saptanamamaktadır. Çünkü memeli hücreleri enerji gereksinime bağlı olarak 1000' in üzerinde mitokondriye, 10000' in üzerinde de mitokondriyal DNA kopyasına sahiptirler (11, 12). Dolayısı ile nuklear genomda meydana gelen bir mutasyon homozigot ise % 100 mutant, heterozigot ise % 50 mutant oranları ile gösterilebilirken, mtDNA kopya sayısının fazlalığına bağlı olarak bu oran % 0-100 arasında herhangi bir değeri alabilmektedir. Böyle bir durumda, bireyin tüm mitokondriyal genom dizilerinin aynı olması homoplazmi, bireyin mtDNA dizilerinin yaşa, mutasyona ya da polimorfizme bağlı olarak farklı varyantlara sahip olması durumu ise heteroplazmi olarak adlandırılmaktadır (70). Böylece heterojen tümör grubunda kontaminasyon sonucunda eşik değeri altındaki heteroplazmik mitokondriyal genomlardaki mutasyonlar saptanamamaktadır.

Amerika' da yer alan Atlanta Morehouse Tıp Fakültesinde erken evre epiteliyal over tümörlerinin heterojen doku örneklerinde mitokondriyal genom değişimlerine yönelik çalışmada, erken seröz epiteliyal over tümörü olgularının % 81' inin D310 bölgesinde TC insersiyonunu saptanmıştır (42). Aynı çalışmada tümörlerde, D310 bölgesindeki sitozin instabilizasyonunun germ line özellik gösterdiği belirtilmiştir (42). Borderline seröz over tümör ve normal hücreler üzerinde yaptığımız mutasyon analizi sonucunda tümör dokularında m.309_310insC mutasyonu saptadık. Bu mutasyon heteroplazmik olmakla beraber, spesifik seröz borderline tümör hücrelerinde belirlenen oranı (9/5) % 67' dir. Değişimin saptandığı borderline seröz tümör dokularından 4 olgunun 3' ünün eşdeğer normal dokularında da benzer değişim saptanmış ve germ line olarak adlandırılmıştır. BO21 nolu olgunun tümör dokusunda m.309_310insC değişimi gözlemlenirken, normal dokusunda m.309_310insCC değişimi belirlenmiştir. Her iki değişim de heteroplazmiktir.

Literatürde, spesifik müsinöz borderline tümör hücrelerinde mitokondriyal genomda ilgili bölgelerdeki değişimleri irdeleyen bir çalışma mevcut değildir. Ancak Aikhiyonbare ve arkadaşları, müsinöz tümör grubunda mitokondriyal genomda D310 bölgesinde m.309_310insC ve m.309_310insCC değişimlerini gözlediklerini belirtmişlerdir. Çalışmamızda spesifik borderline müsinöz tümör dokularının D310 bölgesinde benzer değişimlerin yanı sıra BO7 nolu olgunun tümör dokusunda m.309_310insCCCC değişimi gözlenmiştir. Saptanan değişimler heteroplazmik durumundadır. Bugüne kadar kanserde bulunan mitokondriyal genom değişimleri

homoplazmik olarak belirtilmiştir (6, 25). 2007 yılında Trappen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada tümör hücrelerinde heteroplazmik değişimlerin sebebi olarak stromal hücrelerin kontaminasyonu sonucunda homoplazmik yapıyı maskeleyişini belirtmiştir (6). Ancak çalışmamızda bu yorumun aksine saf hücre populasyonları kullanılarak elde edilen verilerde heteroplazminin varlığı söz konusudur. Dolayısı ile stromal hücrelerin kontaminasyonu ya da farklı tanı almış tümör gruplarını içeren doku örneklerinden elde edilen verilerin tümörün gerçek profilini yansıtmadığı gözlenmektedir.

Çalışmamızda, müsinöz ve seröz tümör gruplarında D310 bölgesinde C₇TC₆ ortak değişimi saptanmıştır. Bu dizide ikinci sitozin tekrarındaki değişim literatürde nadir polimorfizmler arasında belirtilmektedir (38, 42).

Epitelial over tümörlerinin patogenezinin aydınlatılmasında, benignden malign aşamaya geçişini temsil eden borderline over tümörlerinde meydana gelen nükleer ve mitokondriyal genom değişimleri oldukça önem taşımaktadır. Bu aşamada ise tümörlerin gerçek genetik profillerinin aydınlatılmasında LCM sonucunda elde edilen spesifik hücre populasyonları üzerinde yapılan çalışmalar önemli rol oynamaktadır.

Çalışmamızda tek hücre klonal populasyonlarından elde ettiğimiz veriler, önemli olup borderline epitel over tümörlerinde mitokondride “hot-spot” olarak belirtilen 4 mikrosatellit bölgedeki genetik profili ortaya koymaktadır. Elde edilen veriler spesifik benign ve malign over tümörlerinde mitokondriyal genoma yönelik çalışmalara destek sağlamasının yanında, over tümörlerinin patogenezinin aydınlatılmasında da yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Barrett J. Rollins MD PhD, T.R.G.M., Kornelia Polyak MD PhD, Charles D. Stiles PhD Cancer Medicine, (6th Edition).
2. Parr, R.L., et al., *Mitochondrial DNA as a potential tool for early cancer detection*. Hum Genomics, 2006. **2**(4): p. 252-7.
3. Scheffler, I.E., *A century of mitochondrial research: achievements and perspectives*. Mitochondrion, 2001. **1**(1): p. 3-31.
4. Bianchi, N.O., M.S. Bianchi, and S.M. Richard, *Mitochondrial genome instability in human cancers*. Mutat Res, 2001. **488**(1): p. 9-23.
5. Wang, Y., et al., *Microsatellite instability in mitochondrial genome of common female cancers*. Int J Gynecol Cancer, 2006. **16 Suppl 1**: p. 259-66.
6. Van Trappen, P.O., et al., *Somatic mitochondrial DNA mutations in primary and metastatic ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2007. **104**(1): p. 129-33.
7. Kumar, D., Basic Pathology. **7th edition**. Elsevier Science,2003
8. Fukumoto, M. and K. Nakayama, *Ovarian epithelial tumors of low malignant potential: are they precursors of ovarian carcinoma?* Pathol Int, 2006. **56**(5): p. 233-9.
9. Bell, D.A., *Origins and molecular pathology of ovarian cancer*. Mod Pathol, 2005. **18 Suppl 2**: p. S19-32.
10. Hart, W.R., *Borderline epithelial tumors of the ovary*. Mod Pathol, 2005. **18 Suppl 2**: p. S33-50.
11. Modica-Napolitano, J.S., M. Kulawiec, and K.K. Singh, *Mitochondria and human cancer*. Curr Mol Med, 2007. **7**(1): p. 121-31.

12. Verma, M. and D. Kumar, *Application of mitochondrial genome information in cancer epidemiology*. Clin Chim Acta, 2007. **383**(1-2): p. 41-50.
13. Carew, J.S. and P. Huang, *Mitochondrial defects in cancer*. Mol Cancer, 2002. **1**: p. 9.
14. Fernandez-Silva, P., J.A. Enriquez, and J. Montoya, *Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA*. Exp Physiol, 2003. **88**(1): p. 41-56.
15. Chatterjee, A., E. Mambo, and D. Sidransky, *Mitochondrial DNA mutations in human cancer*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4663-74.
16. Kang, D. and N. Hamasaki, *Mitochondrial DNA in somatic cells: a promising target of routine clinical tests*. Clin Biochem, 2005. **38**(8): p. 685-95.
17. Kagan, J. and S. Srivastava, *Mitochondria as a target for early detection and diagnosis of cancer*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2005. **42**(5-6): p. 453-72.
18. Tseng, L.M., et al., *Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in breast cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 2006. **45**(7): p. 629-38.
19. Lee, H.C., et al., *Heteroplasmic mutation of mitochondrial DNA D-loop and 4977-bp deletion in human cancer cells during mitochondrial DNA depletion*. Mitochondrion, 2007. **7**(1-2): p. 157-63.
20. Zhu, W., et al., *Mitochondrial DNA mutations in breast cancer tissue and in matched nipple aspirate fluid*. Carcinogenesis, 2005. **26**(1): p. 145-52.
21. Lee, H.C., et al., *Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1042**: p. 109-22.
22. Sanchez-Cespedes, M., et al., *Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors*. Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 7015-9.
23. Sharma, H., et al., *Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer*. Cancer Cell Int, 2005. **5**: p. 34.
24. Ye, C., et al., *Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region and breast cancer risk*. Breast Cancer Res Treat, 2009.
25. Liu, V.W., et al., *High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas*. Cancer Res, 2001. **61**(16): p. 5998-6001.

26. Clay Montier, L.L., J.J. Deng, and Y. Bai, *Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number*. J Genet Genomics, 2009. **36**(3): p. 125-31.
27. Mambo, E., et al., *Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer*. Int J Cancer, 2005. **116**(6): p. 920-4.
28. Wang, Y., et al., *Association of decreased mitochondrial DNA content with ovarian cancer progression*. Br J Cancer, 2006. **95**(8): p. 1087-91.
29. Jakupciak, J.P., et al., *Analysis of potential cancer biomarkers in mitochondrial DNA*. Curr Opin Mol Ther, 2006. **8**(6): p. 500-6.
30. Sui, G., et al., *Mitochondrial DNA mutations in preneoplastic lesions of the gastrointestinal tract: a biomarker for the early detection of cancer*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 73.
31. Penta, J.S., et al., *Mitochondrial DNA in human malignancy*. Mutat Res, 2001. **488**(2): p. 119-33.
32. Habano, W., S. Nakamura, and T. Sugai, *Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome*. Oncogene, 1998. **17**(15): p. 1931-7.
33. Pinheiro, M., et al., *Mitochondrial genome alterations in rectal and sigmoid carcinomas*. Cancer Lett, 2009.
34. Singh, K.K., et al., *Inter-genomic cross talk between mitochondria and the nucleus plays an important role in tumorigenesis*. Gene, 2005. **354**: p. 140-6.
35. Wang, Y., et al., *Frequent occurrence of mitochondrial microsatellite instability in the D-loop region of human cancers*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1042**: p. 123-9.
36. Tan, D.J., et al., *Significance of somatic mutations and content alteration of mitochondrial DNA in esophageal cancer*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 93.
37. Han, C.B., et al., *Variations of mitochondrial D-loop region plus downstream gene 1 2S rRNA-tRNA(phe) and gastric carcinomas*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(9): p. 1925-9.
38. MITOMAP www.mitomap.org.
39. Aral, C., et al., *A novel approach for rapid screening of mitochondrial D310 polymorphism*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 21.

40. Wang, Y., et al., *The increase of mitochondrial DNA content in endometrial adenocarcinoma cells: a quantitative study using laser-captured microdissected tissues*. Gynecol Oncol, 2005. **98**(1): p. 104-10.
41. Kim, H.S., et al., *Mitochondrial microsatellite instability of colorectal cancer stroma*. Int J Cancer, 2006. **119**(11): p. 2607-11.
42. Aikhionbare, F.O., et al., *Mitochondrial DNA sequence variants in epithelial ovarian tumor subtypes and stages*. J Carcinog, 2007. **6**: p. 1.
43. Yu, M., et al., *Sequence variations of mitochondrial DNA D-loop region are highly frequent events in familial breast cancer*. J Biomed Sci, 2008. **15**(4): p. 535-43.
44. Liu, V.W., et al., *High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas*. Br J Cancer, 2003. **89**(4): p. 697-701.
45. KUZHEY, P.D.G.M., *Temel Patoloji*. Güneş Kitabevi.
46. Farley, J., L.L. Ozbun, and M.J. Birrer, *Genomic analysis of epithelial ovarian cancer*. Cell Res, 2008. **18**(5): p. 538-48.
47. Chen, V.W., et al., *Pathology and classification of ovarian tumors*. Cancer, 2003. **97**(10 Suppl): p. 2631-42.
48. Auersperg, N., et al., *Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 255-88.
49. Kaku, T., et al., *Histological classification of ovarian cancer*. Med Electron Microsc, 2003. **36**(1): p. 9-17.
50. Shih Ie, M. and R.J. Kurman, *Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis*. Am J Pathol, 2004. **164**(5): p. 1511-8.
51. Jones, M.B., *Borderline ovarian tumors: current concepts for prognostic factors and clinical management*. Clin Obstet Gynecol, 2006. **49**(3): p. 517-25.
52. Shih Ie, M. and R.J. Kurman, *Molecular pathogenesis of ovarian borderline tumors: new insights and old challenges*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(20): p. 7273-9.
53. Crispens, M.A., *Borderline ovarian tumours: a review of the recent literature*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2003. **15**(1): p. 39-43.

54. Osterberg, L., et al., *Genetic alterations of serous borderline tumors of the ovary compared to stage I serous ovarian carcinomas*. Cancer Genet Cytogenet, 2006. **167**(2): p. 103-8.
55. Cadron, I., et al., *The management of borderline tumours of the ovary*. Curr Opin Oncol, 2006. **18**(5): p. 488-93.
56. Silverberg, S.G., et al., *Borderline ovarian tumors: key points and workshop summary*. Hum Pathol, 2004. **35**(8): p. 910-7.
57. Soslow, R.A., *Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview*. Int J Gynecol Pathol, 2008. **27**(2): p. 161-74.
58. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications*. Int J Gynecol Pathol, 2008. **27**(2): p. 151-60.
59. Wang, V., et al., *Ovarian cancer is a heterogeneous disease*. Cancer Genet Cytogenet, 2005. **161**(2): p. 170-3.
60. Bernardini, M., J. Weberpals, and J.A. Squire, *The use of cytogenetics in understanding ovarian cancer*. Biomed Pharmacother, 2004. **58**(1): p. 17-23.
61. Ho, C.L., et al., *Mutations of BRAF and KRAS precede the development of ovarian serous borderline tumors*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6915-8.
62. Cheng, E.J., et al., *Molecular genetic analysis of ovarian serous cystadenomas*. Lab Invest, 2004. **84**(6): p. 778-84.
63. Wamunyokoli, F.W., et al., *Expression profiling of mucinous tumors of the ovary identifies genes of clinicopathologic importance*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(3 Pt 1): p. 690-700.
64. McCluggage, W.G., *My approach to and thoughts on the typing of ovarian carcinomas*. J Clin Pathol, 2008. **61**(2): p. 152-63.
65. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri www.saglik.gov.tr.
66. Boyd, J., *Whence epithelial ovarian carcinoma?* Gynecol Oncol, 2008. **109**(2): p. 161-3.
67. Fleming, J.S., et al., *Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **247**(1-2): p. 4-21.

68. Dehari, R., et al., *The development of high-grade serous carcinoma from atypical proliferative (borderline) serous tumors and low-grade micropapillary serous carcinoma: a morphologic and molecular genetic analysis*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(7): p. 1007-12.
69. Krishnamurti, U., et al., *Microdissection-based mutational genotyping of serous borderline tumors of the ovary*. Int J Gynecol Pathol, 2005. **24**(1): p. 56-61.
70. Wong, L.J. and R.G. Boles, *Mitochondrial DNA analysis in clinical laboratory diagnostics*. Clin Chim Acta, 2005. **354**(1-2): p. 1-20.

ÖZGEÇMİŞ

Gökhan GÖRGİŞEN, 09.06.1985 yılında Ankara’ da doğdu. İlköğretimini 1991-1999 yılları arasında Köy Hizmetleri İlkokulu ve Avni Akyol İlköğretim Okulunda, lise öğrenimini, 1999-2003 yılları arasında Ankara Gazi Anadolu Lisesi’ nde tamamladı. 2007 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden üçüncülükle mezun oldu. Aynı yıl TÜBİTAK bursuna hak kazanarak Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik yüksek lisans programına başladı.