

## KOLOREKTAL KANSERLERDEKİ KROMOZOMAL DEĞİŞİKLİKLERİN TESPİTİ<sup>1</sup>

Ş. Derya DEVECİ<sup>1</sup>, Hüseyin YÜCE<sup>1</sup>, Ebru ETEM<sup>1</sup>, Osman DOĞRU<sup>2</sup>, İbrahim ÖZERCAN<sup>3</sup>

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE  
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE  
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 29.11.2004

### Detection of Chromosomal Anomalies Observed in Colorectal Cancers

#### Summary

Colorectal cancer is one of the most common malignancy worldwide. Genetic instability may play an important role in the accumulation of the large amount of genetic alterations during the pathogenesis of cancer. There are two major forms of genetic instability in colorectal cancers that are chromosomal instability and microsatellite instability. We proposed to define P53 gene deletion in colorectal cancers by Fluoresans *in Situ* Hybridization (FISH). We analyzed available 14 tumoral tissue samples from 28 cases whose slides were performed using touch preparation protocol. Conventional cytogenetic examination were performed from 28 cases' blood samples. Interphase FISH study is performed using P53 locus specific DNA probe and examined 500 cells for each patient. No change of P53 gene is observed 64% in patients. 7% of cases were obtained the gain of P53 gene and 29% of cases were obtained the allelic lose of P53 gene. We found statistically significant correlation between P53 gene change and cancer phases and between patient ages and P53 gene change by using Spearman Correlation Test. Interphase FISH is a powerful method which could establish gene deletions and gains in cancers. The relation between P53 gene deletion and colorectal cancer is not yet explained. For this reason, further examinations are needed to use of molecular genetic and immunohistochemical techniques in this subject.

**Key Words:** Colorectal cancer, P53 gene, interphase FISH, genetic instability, microsatellite instability.

#### Özet

Kolorektal kanserler (KRK), dünyada en sık görülen kanserler arasında yer alıp, oluşumunda ve patogenezinde görev alan genetik instabilite, genetik değişimlerin birikiminde önemli bir rol oynamaktadır. KRK'da genetik instabilitenin, mikrosatellit instabilitesi ve kromozomal instabilite olmak üzere 2 büyük sebebi vardır. Bu çalışmada kolon ve rektum kanserlerindeki kromozomal değişiklikler Fluoresans *in-situ* Hibridizasyon (FISH) metodu kullanılarak, P53 gen kaybının ortaya konması amaçlanmıştır. Toplam 28 vakada, kolorektal dokuları elde edilebilen 14 hastanın, 'touching' yöntemi kullanılarak, interfaz-FISH preparatları hazırlandı. Periferik kanı elde edilebilen 28 hastada, konvansiyonel sitogenetik çalışma yapıldı. Dokularından interfaz-FISH preparatı hazırlanan vakalarda, P53 lokus spesifik DNA probu kullanılarak interfaz-FISH çalışıldı ve her hasta için 500 hücre incelendi. Hastaların toplam %64'ünde P53 geninin değişmediği, %7'sinde P53'ün kazancı ve %29'unda P53 kaybı gözlemlendi. Hastanın yaşı ve P53 gen değişimi arasındaki ilişki Spearman Korelasyon Testi'ne göre anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). Kanser evresi ile P53 gen değişimi arasındaki ilişki Spearman Korelasyon Testi'ne göre anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). İnterfaz FISH metodu kanserlerde gen delesyon ve kazancı tespit etmede güçlü bir metottur. P53 gen değişimleri ve KRK arasındaki ilişki hala aydınlatılamamıştır. Bu sebeple, bu konu ile ilgili immunohistokimyasal ve daha ileri genetik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Kolorektal kanser, P53 geni, interfaz FISH, genetik instabilite, mikrosatellit instabilite.

#### Giriş

Kolorektal kanserler (KRK), dünyada en sık görülen malignansilerden biridir. Bu tip kanserlerin gelişiminde, tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve

DNA tamir genleri rol almaktadır (1). KRK'da kromozom 5, 17 ve 18'i içeren delesyonlar, ras onkogenindeki mutasyonlar ve DNA içeriğindeki

<sup>1</sup> Bu çalışma tez çalışmasının özeti olup, FÜBAP 756 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

değişiklikler incelenmiştir (2). KRK'da P53 gen mutasyonları için ilk raporlar 10 yıl öncesine dayanmaktadır (3). Literatürde bu konu hakkında 800'ün üzerinde yayın mevcuttur. İlk çalışmalarda, yabani tip P53 geninin in vitro insan KRK hücre hatlarına transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. İn vitro yabani-tip p53'ün, insan kolorektal kanser hücrelerinin çoğalmasında spesifik olarak baskılayabileceği gösterilmiştir (4). Daha sonra, P53 gen ekspresyonundaki azalmanın özellikle infiltratif davranışa geçmede önemli olduğu tespit edilmiştir (5). P53 genini içeren kromozom 17p bölgesinin allelik kaybının, KRK'da sıklıkla olduğu ortaya konmuştur. İkinci alleldeki mutasyon sonucu, iki alleli kapsayan inaktivasyon ortaya çıkmaktadır. KRK'da P53 mutasyon sıklığı %45 civarındadır (6). Bu oran distal kolon ve rektal tümörlerde daha yüksektir. Buna karşılık proksimal kolon, musinoz ve mikrosateellit instabilitesi görülen tümörlerde daha düşük sıklıktadır. Kromozom 17 ve P53 gen lokusunun translokasyonları, KRK'nın karsinogenezi ile beraberlik gösteren, spesifik genetik olaylar arasında yer almaktadır (7). Adenom-karsinom sürecini destekleyen çalışmalarla KRK epidemiyolojik, klinikopatolojik ve genetik olarak sınıflandırılabilir (8). Bu çalışmada, kolon ve rektum kanserlerinde P53 gen kaybının Fluoresans *in-situ* Hibridizasyon (FISH) metodu kullanılarak ortaya konması, hastalardan alınan periferik kan örneklerinde yapılan sitogenetik analizlerle, kromozomal değişikliklerin değerlendirilmesi, sitogenetik bulguların interfaz-FISH bulgularıyla karşılaştırılması ve kolorektal kanserlerde, kromozom anomalilerinin tespitinde, interfaz-FISH yönteminin uygulama değerinin araştırılması amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

Hastalar, 2002-2003 yıllarında, Fırat Tıp Merkezi Genel Cerrahi Servisine yatan hastalardan seçilmiştir. Çalışmaya alınan toplam 28 kolorektal kanserli vakanın tümünün periferik kanlarında, klasik sitogenetik çalışma yapılırken, kolon-rektum dokuları elde edilebilen 14 vakanın dokularında interfaz FISH tekniği uygulandı. Tüm tümör örnekleri Dukes Sınıflandırmasına göre incelenmiştir. 4 polipoid ve 3 nonpolipoid kolon kanserli hasta, 6 rektum kanserli hasta ve 1 sekum kanserli hastaya FISH çalışması yapıldı. Aynı hastaya ait tümör ve normal doku örnekleri, ameliyat sonrası uzman bir cerrah tarafından seçilerek, transport besiyeri içerisine alınmıştır. Daha sonra dokulardan Touching yöntemi kullanılarak, interfaz-FISH preparatları hazırlandı. Preparatlar derhal -20°C'deki metanol içerisine alındı. Metanolde 20dk bekletildi ve oda

sıcaklığındaki fiksatif (metanol 3: asetik asit 1) içerisinde 20dk tutuldu. %50, %70, %90 ve %96'lık alkol serisinin her birinde 5 dakika bekletildikten sonra havada kurutulan preparatlar kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı. Uzman bir patolog tarafından, kanser tanısı alan hasta örneklerine FISH tekniği uygulandı. P53 gen delesyon veya kazançlarını incelemek için kromozom 17 üzerinde yer alan P53 gen bölgesine spesifik tektas red ile işaretli prob kullanıldı. FISH çalışması için 8 vakanın periferik kan ve normal doku interfaz FISH preparatları kontrol olarak kullanıldı. Her hasta için tümör doku örneğinden hazırlanan preparatlar P53 gen kaybının değerlendirilmesinde kullanıldı. Preparatlar, 2XSSC ile hazırlanmış olan %70'lik formamid solüsyonunda 74°C'de 10 dakika denatüre edildi. Her bir hedef saha için 0.5µl SO(Spectrum orange) DNA prob, 2µl H<sub>2</sub>O ve 7.5µl hibridizasyon tamponu içeren 10µl'lik prob karışımı hazırlandı ve 72°C'lik benmaride 10 dakika denatüre edildi. Hibridizasyon, 37°C'deki benmaride yaklaşık 16 saat bekletilerek gerçekleştirildi. Yıkama aşamasında preparatlar 42°C benmaride, 2xSSC solüsyonunda 5 dk bekletilerek, lamellerin düşmesi sağlandı. 42°C benmaride, içinde %50'lik formamid bulunan üç şalenin, içinde 2xSSC solüsyonu bulunan iki şalenin ve içinde NP-40 yıkama solüsyonu bulunan 1 şalenin, her birinde 5 dakika yıkanan preparatlar, 9,5µl DAPI (4,6 diamino-2-fenil-indol) ve 0,5 µl PI (propodium iodat) karışımı ile boyandı. FISH analizi için interfaz hücrelerinin incelenmesinde, uni-color filtrelerle sahip floresans mikroskop kullanıldı. Her hasta için toplam 500 interfaz hücresindeki sinyallerin sayımı gerçekleştirildi. Kan preparatlarında, hibridizasyon yeterliliği % 95'den daha yüksekti. Normal dokulardan yapılan interfaz FISH preparatlarında, prob için hibridizasyon yeterliliği %92' den daha yüksekti. Her bir hücre için alınan sinyal sayısı 0, 1, 2, 3, 4, 5 ve >6 şeklinde hibridizasyon sinyali olarak kaydedildi.

Hastalardan elde edilen periferik kan örneklerinden, 72 saatlik hücre kültürü yapılarak elde edilen metafaz preparatları, tripsin giemsa bantlama yöntemi (GTG) kullanılarak boyandı. Her hasta için 35 metafaz incelendi.

Veriler, SPSS (Statistical Packages of Social Sciences, SPSS for Windows, Version 9.0, Inc, Chicago, IC, USA) programına kaydedildi. Hata kontrolleri ve istatistiki analizler yine bu programda yapıldı. Verilerin önemlilikleri ve aritmetik ortalamaları standart sapma ile gösterildi. Mann-Whitney Testi, hasta yaşı ve kromozomal aberasyonlar arasındaki ilişkinin ortaya konması için kullanıldı. Spearman Korelasyon Testi, hem hasta

yaşı ve P53 gen değişimleri arasındaki ilişkinin, hem de kanserin evresi ve P53 gen değişimleri arasındaki ilişkinin ortaya konması için yapıldı.

### Delesyon ve Kazanç Tespitinde Kullanılan FISH Kriterleri:

Bu çalışmada, kolorektal kanser dokularında P53 gen delesyon ve kazanç varlığının ortaya konması için Xinwei ve arkadaşlarının yaptıkları, doku interfaz-FISH çalışması kriterleri kullanılmıştır. Xinwei ve arkadaşları, yaptıkları interfaz-FISH çalışmasında, hücrelerin %20'sinden daha fazlasında, P53 probu için 1 sinyal alındığı durumlar, P53 gen kaybı olarak değerlendirilmiştir (9).

### Bulgular

Çalışmaya alınan toplam 28 vakanın periferik kanlarında yapılan klasik sitogenetik çalışmada 17

hastanın karyotipi 46,XY, 6 hastanın karyotipi 46,XX olarak bulunmuştur. Kromozom anomalisi bulunan 5 hastanın karyotipi Tablo 2'de verilmiştir. Aneusominin tanımlanması için hücrelerin çoğunda görülen sinyal sayısı kriter alındı. Bütün dokular için kontrol olarak kullanılan, normal dokularda, P53 için dizomik sinyaller alındı. Kromozom 17p13.1 bölgesinde yer alan, P53 geni için 2 sinyalin alındığı durumlar, normal (dizomik) olarak değerlendirilirken, 1 ve 3 sinyalin alındığı durumlar, anormal yani monozomik ve trizomik olarak değerlendirildi. Hastaların toplam %64'ünde P53 geninin değişmediği, %7'sinde P53'ün kazancı ve %29'unda P53 kaybı gözlemlendi. P53 geni için alınan sinyal sayısı ve yüzdeleri Tablo 1'de verildi.

Tablo 1: Kolorektal kanser dokularında P53 gen aberasyonu çalışılan her bir hasta için 500 interfaz hücresinden FISH ile alınan sinyal sayıları.

Hasta No	Sinyal Sayısı						Hücrelerde görülen sinyal sayıları ve %'leri
	1	2	3	4	5	6>	
1	140	350	10	0	0	0	1(%28), 2(%70)
2	269	225	4	2	0	0	1(%53.8), 2(%45)
3	125	370	15	0	0	0	1(%25), 2(%74)
4	360	120	16	4	0	0	1(%72.4), 2(%24)
5	39	420	25	14	0	2	1(%7.8), 2(%84)
6	66	413	26	3	0	2	1(%13.2), 2(%82.6)
7	64	432	4	0	0	0	1(%12.8), 2(%86.4)
8	11	452	23	13	1	0	1(%2.2), 2(%81.4)
9	32	426	36	6	0	0	1(%6.4) 2(%85.2)
10	28	384	69	13	6	0	1(%5.6) 2(%76.8) 3(%13.6)
11	65	282	150	5	0	0	1(%13), 2(%56.4), 3(%30)
12	31	444	20	3	0	2	1(%6.2), 2(%88.5)
13	64	420	16	0	0	0	1(%12.8), 2(%84)
14	22	435	33	7	1	2	1(%4.4), 2(%87)

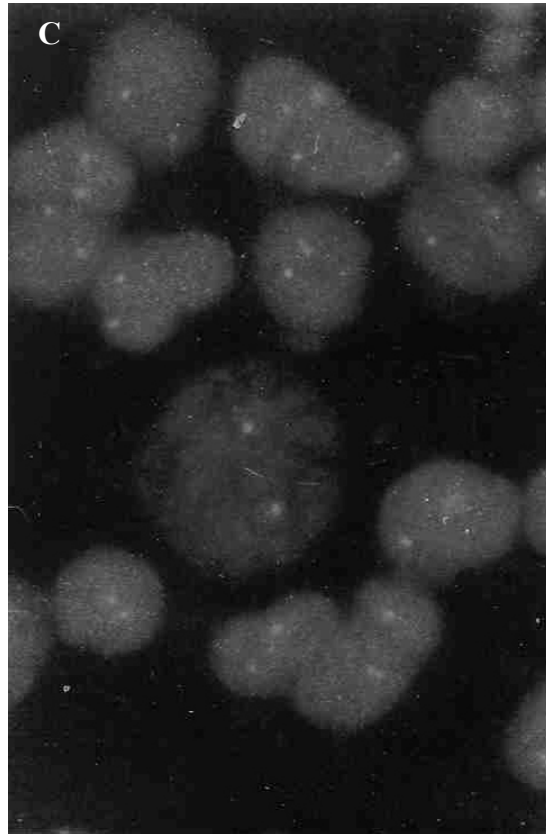
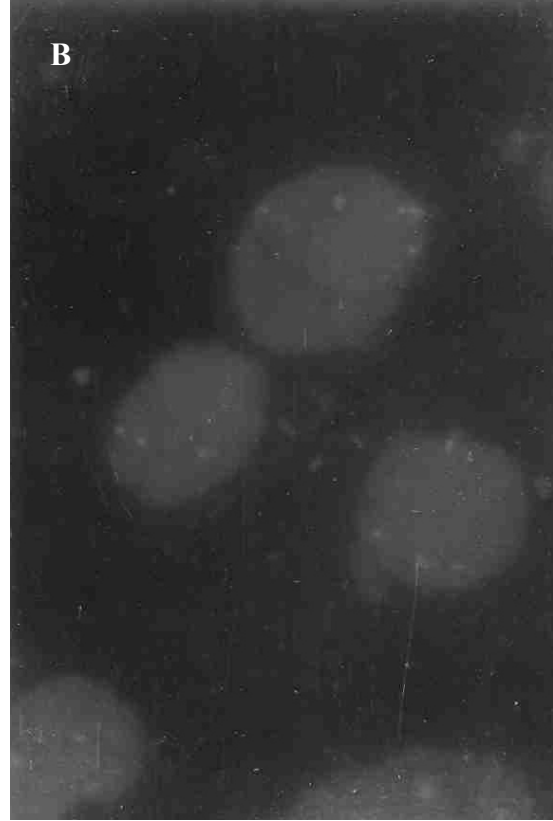
Tablo 2: Periferik kanları elde edilen vakaların klasik sitogenetik çalışma sonuçları.

Hasta No	Hastaların periferik kan karyotipleri
3	46,XY, del(14p <sup>-</sup> )
11	46,XX, 17qh(+)
19	46,XX(%85)/46,XX, t(13;17)(q;p)(%15)
24	46,XY, 13qh(+)(%85)/46,XY(%15)
26	46,XX (%90)/47,XX, +21(%10)
28	46,XY(%90)/45,XY,-13(%10)

P53 FISH sonuçları Şekil 1'de gösterildi. Periferik kandan yapılan sitogenetik değerlendirme-

de, karyotiplerinde anormallik bulunan hastaların, klasik sitogenetik çalışma sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Diğer hastaların karyotipleri normal olarak değerlendirilmiştir.

Kolorektal kanserli hastaların yaş ortalaması 55 idi. Hastanın yaşı ile kromozomal aberasyonlar arasındaki ilişki, Mann-Whitney testine göre, veriler parametrik olmadığı için önemsiz bulundu. Hastanın yaşı ile P53 geni arasında ve TNM evresi ile P53 geni arasında anlamlı bir ilişki ( $p<0.05$ ) bulundu. Hastanın yaşı ile P53 gen kaybı arasındaki ilişki anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ).



Şekil 1: P 53 için hibridizasyon sinyalleri. A. P 53 için monozomik sinyal. B. P53 için dizomik sinyal. C. P53 için trizomik sinyal.

### Tartışma

P53 genindeki delesyon veya nokta mutasyonu şeklindeki değişimlere, insan kanserlerinde oldukça sık rastlanmaktadır. P53 gen değişimlerinin, KRK'nın gidişatıyla ilişkili olduğuna dair oldukça fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla beraber yayınlanmış pek çok araştırmada kesin açıklamalar mevcut değildir. KRK'da P53 geninin tam delesyonları, LOH ve translokasyonları oldukça nadir bir bulgudur (7, 10, 11, 12,16). Forslund ve arkadaşları 123 hastada yaptıkları bir çalışmada, moleküler genetik metotlarla heterozigosite kaybını (loss of heterozygosity: LOH) değerlendirmişlerdir. Hastaların ancak %5'inde LOH'un varlığını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada hastaların %44'ünde P53 gen mutasyonları tespit edilirken, hastaların %49'unda herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir (6). Nanashima ve arkadaşları ise adenokarsinomlarda P53 gen delesyon oranını %19 olarak bulmuşlardır (13). Çalışmamızda hastaların %29'unda P53 kaybı gözlemlendi. Bu oran FISH yöntemi kullanılarak, P53 gen kaybı üzerine yapılan diğer çalışmalardan daha yüksektir. Bunun en önemli sebeplerinden biri hasta sayısının sınırlı olmasıdır.

Porcelli ve arkadaşları, benign ve malign KRK'da yaptıkları çalışmada, P53 gen ekspresyon düzeyini, immünohistokimyasal metotlar kullanarak değerlendirmişler ve özellikle ilerlemiş safhalarda P53 boyanmasında artış olduğunu göstermişlerdir (10). Bazı KRK'larda ileri dönemlerde, P53 gen delesyonları değil de kromozom 17'nin tüm kazancı veya P53 gen bölgesini içeren bir kazanç gerçekleşebileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda, hastaların büyük bir kısmında, P53 geninin delesyona uğramadığı tespit edildi. Ancak, genin yabancı tip ürün ortaya koyup koymadığı bilinemediğinden, P53'ün bu aşamada fonksiyonel olup olmadığı söylenemez.

P53 gen delesyonlarının tespitinde, farklı delesyon kriterleri kullanılabilir. Yakut ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma referans alındığında (P53 için, hücrelerin en az %8 ve üzerinde alınan tek sinyali delesyon olarak değerlendirmişlerdir), P53 gen delesyonuna sahip hasta sayısı artmaktadır (14). İstatistik veriler, P53 gen kaybının %8 ve üstü veya %20 ve üstü olmasına göre, çok önemli farklılıklar göstermediğini ortaya koymasına rağmen, 3 örnekte hücre sayısının az olması ve yüzey boyamasının yetersizliğinden, hücre sınırlarının tam gözlenememesi sebebiyle, delesyon değerlendirmesinde, Xinwei ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma kriter olarak alındı (9). %8-%20 arasında kalan değerlere ise P53 gen delesyonları açısından şüpheyle yaklaşıldı ve bu 3 örnekte, P53 gen delesyonunun gerçekleşmediği kabul edildi. FISH metodu kullanılarak yapılacak gen delesyon analizlerinde, preparasyondaki yeterliliğe bağlı olarak her iki çalışmanın sonucunun, delesyon kriteri olarak kullanılabileceği kanaatindeyiz.

Çalışmada kullandığımız FISH metodu, solid tümörlerdeki kromozomal ve gen değişimlerinin ortaya konmasında oldukça güçlü bir yöntemdir. FISH metodu ile delesyon değerlendirilmesi yapılırken, mutlaka proliferasyon indeksi göz önünde bulundurulmalıdır. Çünkü, tümör dokusu içerisinde

gerçekleşen hızlı proliferasyon sebebiyle, kromatidlerine ayrılan kromozomların varlığı, yalancı pozitif sinyallerin görülmesine sebep olabilir. FISH metodunun bir dezavantajı, delesyonların tespitinde oldukça spesifik bir yöntem olmasına karşılık, gendeki nokta mutasyonları ortaya koyamamasıdır. Bu yüzden, FISH ile KRK'da P53 gen delesyonları tespit edilemeyen hastalarda, moleküler genetik metotlarla P53 gen mutasyonlarının taranması gerekmektedir.

Çalışmada P53 gen değişimleri ve hasta yaşı ile kanserin evresi ve P53 geni arasında bir korelasyonun olduğu tespit edildi. Ancak, hasta sayısının azlığından dolayı, bu bulguyu destekleyecek, daha fazla hasta sayısını içeren çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Wang ve arkadaşları, 18 KRK'lı hastanın tümör dokularında yaptıkları sitogenetik çalışmada, kromozom 5q delesyonu ve t(13;17)(q;p) saptamışlardır (15). Wang ve arkadaşlarının çalışmasıyla paralel olarak, periferik kanda klasik sitogenetik çalışılan, vaka 19'da metafazların %15'inde 46,XX, t(13;17)(q;p) gözlenirken, hastalığın ileri fazında olmasına rağmen, kromozom 5q delesyonuna rastlanmamıştır. Özellikle bu vakada periferik kanda bu tip bir translokasyonun bulunması, tümördeki bazı karyotipik değişikliklerin, kanserli hastaların periferik kan karyotiplemesiyle de elde edilebileceğini göstermesi açısından oldukça önemlidir.

Etyopatogenetik süreci oldukça karmaşık olan kanserlerde, erken evrelerden itibaren değişimi gösterilen P53 geninin fonksiyonel değerlendirilmesinde, pratik ve bilgi verici bir yöntem olan interfaz-FISH çalışmalarının, LOH ve immünohistokimyasal yöntemlerle kombine edilerek, daha geniş vaka içeren gruplarda uygulanması, daha güvenilir bilgiler sağlayabilir. P53 geninin, KRK progresyonunda fonksiyon görmemesinin sebebi hala tam olarak aydınlatılmayı bekleyen bir araştırma sahasıdır.

## Kaynaklar

1. He OJ, Zeng WF, Sham JST, Xie D, Yang XW, Lin HL et al. Recurrent genetic alterations in 26 colorectal carcinomas and 21 adenomas from Chinese patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2003; 144: 112-118
2. Delattre O, Olschwang S, Law DJ, Melot T, Renvikos Y, Salmon RJ et al. Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet* 1989; 2: 353-356
3. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM et al. Chromosome 15 deletion and P53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244:217-221
4. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249: 912-915

5. Purdie CA, O' Grady J, Piris J, Wyllie AH, Bird CC. P53 expression in colorectal tumors. *American Journal of Pathology* 1991; 138: 807-813
6. Forslund A, Kressner U, Lonnroth C, Andersson M, Lindmark G, Lundholm K. P53 mutations in colorectal cancer assessed in both genomic DNA and cDNA as compared to the presence of P53 LOH. *International Journal of Oncology* 2002; 21: 409-415
7. Tagawa Y, Nanashima A, Tsuji T, Sawai T, Yamaguchi H, Yasutake T et al. Importance of cytogenetic markers for multiple primary carcinomas in colorectal cancer: chromosome 17 and P53 locus translocation. *Journal of Gastroenterology* 1998; 33: 670-677
8. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJC. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *British Journal of Surgery* 2002; 89: 845-860
9. Xinwei L, Tatsuo T., Shumin W., Yuka M., Kohsuke S., Fumihiko S. Detection of Numeric Abnormalities of Chromosome 17 and P53 Deletions by Fluorescence In Situ Hybridization in Pleomorphic Adenomas and Carcinomas in Pleomorphic Adenoma. *Cancer* 1997; 79:12.
10. Porcelli B, Frosi B, Terzuoli L, Arezzini L, Marinello E, Vernillo R et al. Expression of p185 and P53 in benign and malignant colorectal lesions. *Histochemical Journal* 2001; 33: 51-57
11. Bamme L., Lothe R., Bandi G., Fenger C., Kronborg O., Heim S. (2001). Assessments Of Clonal Composition Of Colorectal Adenomas By FISH Analysis Of Chromosome 1, 7, 13 and 20. *International Journal Of Cancer*. 92:816-823.
12. Cho K., Volgestein B. (1992). Supressor Gene Alterations In The Colorectal Adenoma-Carcinoma Sequence. *Journal Of Cellular Biochemistry* 16:137-141.
13. Nanashima A, Tagawa Y, Yasutake T, Taniguchi Y, Sawai T, Nakagoe T, Ayabe H. Analysis of P53 gene deletions in colorectal cancers using fluorescence in situ hybridization. *Surg Today*. 1997; 11:999-1004.
14. Yakut T., Bekar A., Doygun M., Acar H., Egeli U., Ogul E. Evaluation of Relationship Between Chromosome 22 and P53 Gene Alterations and the Subtype of Meningiomas by the Interphase-FISH technique. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 2002; 22:217-225.
15. Wang L., Li L., Zhou Y., Gao X., Li J. (1992). t(13q;17p) And del.(5q): Possibly Spesific Changes In Chinese Patients With Colorectal Cancers. *Cancer Genetics And Cytogenetics* 62:191-196.
16. Beroud C, Soussi T. The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. *Human Mutation* 2003; 21: 176-181