

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI  
BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS (TEZLİ) PROGRAMI

**NON-HODGKİN LENFOMALI OLGULARDA  $p15^{INK4B}$   
PROMOTÖR BÖLGESİNDEKİ DNA METİLASYONUNUN  
ARAŞTIRILMASI**

Pelin EROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Serap YALIN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
BAP-SBE BK (PE) 2005-1 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 84

MERSİN – 2007

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı Biyokimya Bölümü Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan '**Non-Hodgkin Lenfomalı Olgularda p15<sup>INK4B</sup> Promotör Bölgesindeki DNA Metilasyonunun Araştırılması**' adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi **20.04/2007**



Doç. Dr. Serap YALIN

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Başkanı



Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi



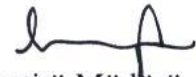
Prof. Dr. Lülüfer TAMER

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun **01.05.2007** tarih ve **2007/106** sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren ve tez çalışmam süresince engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yardım ve katkılarını esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Sn. Doç. Dr. Serap YALIN'a teşekkür ederim.

Tezimin başlangıcından itibaren fikirleri ile bana yol gösteren, destek ve yardımlarını esirgemeyen Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sn. Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN'e teşekkür ederim.

Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'na katkı ve desteğinden dolayı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sn. Prof. Uğur ATİK'e teşekkür ederim.

Hasta grubunun örneklerinin toplanmasındaki katkı ve yardımlarından dolayı İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı Başkanı ve Dekanımız Sn. Prof. Dr. Atilla YALÇIN'a ve Adana Numune Hastanesinden Sn. Doç. Dr. Burhan HAZAR'a teşekkür ederim.

Bu çalışma için laboratuvar olanaklarını istifademize sunan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sn. Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ'a ve Sn. Doç. Dr. Gönül ASLAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca ilgi ve samimiyeti ile desteğini her zaman hissettiğim, arkadaşım Arş. Gör. Seda TEZCAN'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni manevi açıdan sürekli destekleyen ve her zaman yanımda olan AİLEME sonsuz teşekkürler.

**Pelin EROĞLU**

# İÇİNDEKİLER

<b>Kabul ve Onay</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>vii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	<b>ix</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>x</b>
<b>ÖZET</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. DNA Metilasyonu	3
2.1.1. DNA Metilasyonu ve Gen Regülasyonu	7
2.1.2. DNA Metilasyonu ve Kanser	10
2.1.3. DNA Metilasyonunun Kanser Gelişimindeki Rolü	10
2.1.4. Hipermetilasyon	13
2.1.5. Kanserde Hipometilasyon	16
2.1.5.1. Onkogen Aktivasyonu	16
2.1.5.2. Retrotransposon Aktivasyonu	16
2.1.5.3. Kromozomal İnstabilite	17
2.1.6. CpG Adacıklarının Geniş Skalalı Metilasyon Analizi	17
2.1.7. Kanserin Erken Tanısında DNA Metilasyonu	21
2.1.8 DNA Metilasyonu ve Yeni Terapötik Stratejiler	22
2.2. Lenfoma	24
2.2.1. Hodgkin Lenfoma	25
2.2.2. Non-Hodgkin Lenfoma	26
2.2.3. NHL'ların Sınıflandırılması	27
2.2.3.1. Yenilenmiş Avrupa-Amerika Lenfoid Neoplazm (REAL) ve Word HealthOrganization (WHO) Sınıflaması	28
2.2.3.2. Working Formulation	28
2.2.3.3. Histopatolojik Sınıflandırma	29

2.2.4. NHL Tipleri	29
2.2.4.1. Küçük Lenfositik Lenfoma	29
2.2.4.2. Foliküler Lenfoma	30
2.2.4.3. Mantle Hücreli Lenfoma	32
2.2.4.4. Diffüz Büyük Hücreli Lenfoma	33
2.2.4.5. Lenfoblastik Lenfoma	34
2.2.4.6. Küçük Çentiksiz (Burkit) Lenfoma	36
2.2.5. Diğer NHL'lar	37
2.2.5.1. MALT Lenfoma	37
2.2.5.2. Mikozis Fungoides ve Sezary Sendromu	37
2.2.5.3. Yetişkin T hücreli Lösemi/Lenfoma	38
2.2.6. Epidemiyoloji	38
2.2.7. Etiyoloji	40
2.2.7.1. İmmün Yetmezlikler	40
2.2.7.1.1. Kongenital İmmün Yetmezlik Hastalığı	40
2.2.7.1.2. Kazanılmış İmmün Yetmezlik	41
2.2.7.2. Otoimmün Hastalıklar	41
2.2.7.3. Kimyasal ve Fiziksel Ajanlar	41
2.2.8. NHL'da Tanı ve Evreleme	42
2.2.8.1. Ann Arbor Evrelemesi	42
2.3. <i>p15<sup>INK4B</sup></i> (MTS2) Geni	44
2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Tekniği	50
2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bileşenleri	50
2.4.1.1. Kalıp DNA	51
2.4.1.2. Primerler	51
2.4.1.3. Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dNTPs)	52
2.4.1.4 DNA-Polimeraz Enzimleri	52
2.4.1.5. Tamponlar ve MgCl <sub>2</sub> Karışımı	53
2.4.2. PCR Evreleri	54
2.4.3. "Hot Start" (Sıcak Başlangıç) PCR Tekniği	58
2.5. Amplifikasyon Ürünlerinin Analizi	58
2.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi	58

<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>60</b>
3.1. Hasta Grubu Kan Örneklerinin Toplanması	60
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	60
3.2.1. Kullanılan Cihazlar	60
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	61
3.2.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler	62
3.2.3.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar	62
3.2.3.2. Bisülfid Modifikasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar	64
3.2.3.3. DNA Metilasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar	65
3.2.3.4. Elektroforez için Kullanılan Solüsyonlar	66
3.3. Kullanılan Yöntemler	67
3.3.1. DNA İzolasyonu	67
3.3.2. Bisülfid Modifikasyonu	68
3.3.3. Modifiye DNA Örneklerinin Saflaştırılması	68
3.3.3.1. "Wizard SV Gel" ve "PCR Clean-Up" Sistemi	69
3.3.3.2. Amonyum Asetat ile Saflaştırma Yöntemi	70
3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulaması	70
3.3.5. Agaroz Jel Elektroforez Tekniği	74
3.3.5.1. Agaroz Jelin Hazırlanması	74
<b>4. BULGULAR</b>	<b>75</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>80</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	<b>86</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>87</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>95</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1</b> DNA metilasyon mekanizması	<b>3</b>
<b>Şekil 2.2</b> S-Adenozilmetiyonin metabolizması	<b>5</b>
<b>Şekil 2.3</b> Memeli gelişimi esnasında DNA metilasyonunda değişiklikler	<b>7</b>
<b>Şekil 2.4</b> DNA metilasyonunun transkripsiyonel represyona neden olmasına ilişkin önerilen mekanizma	<b>9</b>
<b>Şekil 2.5</b> Artmış CpG adacıklarının muhtemel rolü ve tümör gelişiminde global DNA metilasyonunun azalması	<b>10</b>
<b>Şekil 2.6</b> DNA metilasyonundaki biyokimyasal yollar	<b>11</b>
<b>Şekil 2.7</b> Kansere neden olan DNA metilasyonunun farklı mekanizmaları	<b>13</b>
<b>Şekil 2.8</b> Genomik dizide bisülfid değişimi ile sitozin metilasyonunun belirlenmesi	<b>20</b>
<b>Şekil 2.9</b> Tümör supressör geninin promotör bölgesinin tesadüfi metilasyonu ile ekspresyonunun inaktivasyonunu gösteren model	<b>23</b>
<b>Şekil 2.10</b> Hodgkin Lenfoma'nın karakteristik Reed-Stenberg hücresi ve onu çevreleyen mononükleer varyantlar	<b>26</b>
<b>Şekil 2.11</b> B ve T hücre diferansiasyonunda meydana gelen fenotipik ve genotipik değişikliklerin şematik resmi	<b>27</b>
<b>Şekil 2.12</b> Küçük lenfoblastik lenfoma	<b>30</b>
<b>Şekil 2.13</b> Foliküler küçük çentikli hücreli lenfoma	<b>31</b>
<b>Şekil 2.14</b> Mantle hücreli lenfoma	<b>32</b>
<b>Şekil 2.15</b> Difüz büyük hücreli tip	<b>34</b>
<b>Şekil 2.16</b> Lenfoblastik tip	<b>35</b>
<b>Şekil 2.17</b> Burkitt tipi	<b>36</b>
<b>Şekil 2.18</b> Non- Hodgkin Lenfomalı hastaların yaş dağılımı	<b>40</b>
<b>Şekil 2.19</b> Hücre siklus modeli ve her bir hücre siklus fazında gerekli olan siklin/cdk kompleksleri	<b>45</b>
<b>Şekil 2.20</b> 9p21 bölgesi üzerindeki INK4 lokusu	<b>47</b>
<b>Şekil 2.21</b> Lösemi ve lenfomada CpG adacıklarındaki hipermetilasyonun profili	<b>48</b>
<b>Şekil.2.22</b> PCR aşamaları	<b>54</b>
<b>Şekil 2.23</b> Zincir uzaması	<b>56</b>
<b>Şekil 2.24</b> PCR döngüleri	<b>57</b>

**Şekil 4.1**  $p15^{INK4B}$  Metilasyon spesifik, unmetilasyon spesifik ve wild tip spesifik primerler ile yapılan PCR amplifikasyonu ve elde edilen ürünlerin % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile analizi **76**

**Şekil 4.2** Unmetil primerler kullanılarak MSP yöntemi ile amplifiye edilen 154 bp'lık  $p15^{INK4B}$  geni fragmentlerinin % 2'lik agaroz jel görüntüsü **77**



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1</b> Kanserde hipermetilasyon gösteren bazı genler	<b>15</b>
<b>Çizelge 2.2</b> Aberant DNA metilasyonu ile sessizleşen genler ve insan tümör hücre serilerinde 5-aza-2-deoksisitidin ile aktivasyonu	<b>22</b>
<b>Çizelge 2.3</b> Ann Arbor sınıflandırması	<b>43</b>
<b>Çizelge 3.1</b> $p15^{INK4B}$ genindeki metilasyonun PCR ile belirlenmesinde kullanılan primerler	<b>71</b>
<b>Çizelge 3.2.</b> Metilasyon spesifik PCR karışımları	<b>71</b>
<b>Çizelge 3.3</b> Metilasyon spesifik olmayan ve wild-type PCR reaksiyon karışımları	<b>72</b>
<b>Çizelge 3.4</b> Metilasyon spesifik ve spesifik olmayan PCR’da uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri	<b>73</b>
<b>Çizelge 3.5</b> Wild-type PCR’da uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri	<b>73</b>
<b>Çizelge 4.1</b> NHL’lı olgularının $p15^{INK4B}$ genindeki metilasyon durumları	<b>78</b>
<b>Çizelge 4.2</b> NHL’lı olgularının cinsiyete göre yaş ortalamaları ve metilasyon Yüzdeleri	<b>79</b>
<b>Çizelge 4.3</b> NHL’lı olgularda ve kontrol grubunda $p15^{INK4B}$ genindeki metilasyon yüzdeleri	<b>79</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AIDS:</b>	Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu
<b>ALL:</b>	Akut Lenfositik Lösemi
<b>AML:</b>	Akut Myeloblastik Lösemi
<b>APL:</b>	Akut Premyelositik Lösemi
<b>BCL:</b>	B-Hücreli Lenfoma
<b>bp:</b>	Baz Çifti
<b>CDK:</b>	Siklin Bağımlı Kinaz
<b>CDKI:</b>	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
<b>cDNA:</b>	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
<b>CML:</b>	Kronik Myelogenous Lösemi
<b>CpG:</b>	Sitozin Fosfat Guanin
<b>DAPK:</b>	Ölümlle İlişkili Protein Kinaz
<b>DLBL:</b>	Diffüz Büyük Hücreli Lenfoma
<b>dATP:</b>	Deoksiadenozin Trifosfat
<b>dCTP:</b>	Deoksisitozin Trifosfat
<b>dGTP:</b>	Deoksiguanozin Trifosfat
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>dNTP:</b>	Deoksiribonükleotid Trifostat
<b>dTTP:</b>	Deoksitimidin Trifosfat
<b>Et-Br:</b>	Etidyum Bromid
<b>EDTA:</b>	Etilendiamintetraasetik asit
<b>EBV:</b>	Epstein-Barr Virüs
<b>GST:</b>	Glutasyon S-transferaz
<b>HDAC:</b>	Histondeasetilaz
<b>HL:</b>	Hodgkin Lenfoma
<b>HTLV:</b>	T-Hücreli Lösemi Virüsü
<b>Ig:</b>	Immunoglobülin
<b>IGF:</b>	İnsülin-Like Growth Faktör
<b>INK4:</b>	CDK4'nın İnhibitörü

<b>Kb:</b>	Kilobaz
<b>KCl:</b>	Potasyum Klorür
<b>MBD:</b>	Metil Binding Domain
<b>mC:</b>	Metil Sitozin
<b>MDS:</b>	Myeloblastik Sendrom
<b>MeCP:</b>	Metil CpG Binding Protein (Methylated CpG-binding proteins)
<b>MF:</b>	Mikozis Fungoides
<b>Mg<sup>+2</sup>:</b>	Magnezyum İyonu
<b>MgCl<sub>2</sub>:</b>	Magnezyum Klorür
<b>MSP:</b>	Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>NaCl:</b>	Sodyum Klorür
<b>NHL:</b>	Non-Hodgkin Lenfoma
<b>PCR:</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>pRb:</b>	Fosforillenmiş Retinoblastoma
<b>Rb:</b>	Retinoblastoma
<b>REAL:</b>	Yenilenmiş Avrupa ve Amerika Lenfoid Neoplazm
<b>RLGS:</b>	Restriction Landmark Genomik Scanning
<b>RS:</b>	Reed-Stenberg
<b>SAH:</b>	S-Adenozilhomosistein
<b>SAM:</b>	S-Adenozilmetiyonin
<b>SDS:</b>	Sodyum Dodesil Fosfat
<b>SLL:</b>	Küçük Lenfoblastik Lenfoma
<b>TBE:</b>	Tris-Borik Asit-EDTA
<b>TCL:</b>	T-Hücreli Lenfoma
<b>TGF:</b>	Transforming Growth Factor
<b>TMS:</b>	Transmembran Segmenti
<b>Tris-HCl:</b>	Tris Hidroklorid
<b>TS:</b>	Tümör Supressör
<b>UV:</b>	Ultraviyole
<b>WF:</b>	Working Formulation
<b>WHO:</b>	World Health Organization
<b>XLP:</b>	X'e Bağlı Lenfoproliferatif Sendrom

## ÖZET

### Non-Hodgkin Lenfomalı Olgularda $p15^{INK4B}$ Promotör Bölgesindeki DNA Metilasyonunun Araştırılması

DNA'nın metilasyonu, memeli hücrelerinde gen ekspresyonunun kontrolünde önemli rol oynayan yaygın epigenetik bir modifikasyondur. Aberant DNA metilasyonu, CpG adacıkları olarak adlandırılan bölgelerde CpG dinükleotidlerindeki sitozinlerde gözlenir.

Genlerin promotör bölgelerindeki DNA metilasyonu tümör supressör genlerin inaktivasyonunun esas mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır. CpG adacıklarının aberant metilasyonu gen ekspresyonunun kaybı ile korelasyon göstermektedir. DNA metilasyonu, kanserin başlangıcı ve gelişimi ile ilişkili önemli bir moleküler markır olarak büyük bir potansiyel göstermektedir.

Aberant promoter metilasyon farklı malignant hastalıklarda çeşitli genlerde tanımlanmıştır. Siklin bağımlı kinaz inhibitör (CDKI) geni  $p15^{INK4B}$ , genetik değişimlerle sıklıkla inaktive edilmektedir.  $p15^{INK4B}$  geninin inaktivasyonu hücre siklus kontrol kaybı ve tümör hücrelerinin aberant proliferasyonu ile ilişkilidir. Bu inaktivasyon farklı hematolojik malignansilerde gerçekleşen bir olay olarak görülmektedir.

Bu çalışmada, 40'ı erkek ve 22'si kadın olmak üzere toplam 62 Non-Hodgkin lenfomalı hasta ve 36 erkek, 4 kadın olmak üzere 40 kontrol grubuna ait kan örneklerinde  $p15^{INK4B}$  geninin promotör bölgesindeki muhtemel metilasyon durumu araştırılmıştır. Çalışmada metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılmış ve hastaların % 16'sında hipermetilasyon saptanmıştır. NHL'lı hastalarda DNA metilasyonunun görülme sıklığı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

**Anahtar kelimeler:** DNA metilasyonu, CpG, aberant,  $p15^{INK4B}$ , siklin bağımlı kinaz inhibitörü, metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu

## ABSTRACT

### The Searching of DNA Methylation in the Region of $p15^{INK4B}$ Promotor in the Cases with Non-Hodgkin Lymphoma

The methylation of DNA is a common epigenetic modification that can play an important role in the control of gene expression in mammalian cells. Aberrant methylation of DNA is observed at cytosines within a CpG dinucleotide in the regions called CpG islands.

DNA methylation of the promoter region of genes has emerged as the major mechanism of inactivation of tumor suppressor genes. Aberrant methylation of the CpG island genes has been correlated with loss of gene expression. DNA methylation shows a great potential as an important molecular marker related to beginning and developing process of cancer.

Aberrant promoter methylation has been described for several genes in various malignant diseases. Cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) gene  $p15^{INK4B}$  is frequently inactivated by genetic alterations. Inactivation of the  $p15^{INK4B}$  gene is associated with loss of cell cycle control and aberrant proliferation of tumor cells. This inactivation seems to be a frequent event in various haematological malignancies.

In this study, 62 Non-Hodgkin lymphoma patients, 40 of whom are men and 22 of whom are women and the possible methylation situation in the promotor region of  $p15^{INK4B}$  gene in the blood samples which belong to 40 control group, 36 of whom are men and 4 of whom are women, were studied. In the study, methylation specific chain reaction method was used and in the % 16 of the patients hypermethylation was found. In the patient with NHL, the frequency of DNA methylation was found statistically meaningful relative to the control group.

**Key words:** DNA methylation, CpG, aberrant,  $p15^{INK4B}$ , cyclin-dependent kinase inhibitory, methylation spesific polymerase chain reaction

# 1. GİRİŞ

DNA metilasyonu transkripsiyonel kontrolün önemli bir mekanizmasıdır (1). Onkogenezisteki DNA metilasyonunun muhtemel rolü uzun yıllardan beri tartışılmaktadır. Son yıllarda yapılan bir çok çalışmada DNA metilasyonunun kanser oluşumunda önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Farklı genlerde tümör spesifik metilasyon değişimleri tanımlanmıştır (2).

DNA metilasyonu, aynı zamanda hücrel fonksiyonlarda embriyonik gelişim, gen ekspresyonunun regülasyonu, X kromozomu inaktivasyonu ve kromatin modifikasyonunda görev alır. Epigenetik modifikasyonlardan, global hipometilasyon kromozom instabilitesi, mobil DNA ve onkogen aktivasyonuna neden olurken, hipermetilasyon, tümör suppressör genlerin promotör bölgelerinin transkripsiyonunu repress eder (3).

Non-hodgkin lenfoma (NHL) lenfoid sistemi oluşturan hücrelerden kaynaklanan malign bir hastalıktır. Heterojen bir hastalık grubu olduğundan dolayı dünyada hala sınıflaması tam yapılamamıştır ve her yıl yeni bir sınıflama yapılmaktadır. NHL'ların % 70'i B lenfositlerden % 30'u T lenfositlerden köken alır (4).

Non-Hodgkin lenfomalar ABD'de kansere bağlı ölüm sebepleri arasında beşinci sırada yer almaktadır ve insidansı 1973 yılından bu yana yaklaşık olarak iki katına çıkmıştır. NHL insidansındaki bu artışın nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, özellikle bağışıklık sistemi zayıf kişilerin bu kanser türüne yakalandıkları araştırmalar sonucu belirtilmiştir. Epstein-Barr virüsünün NHL'i arttırdığı yönünde çalışmalarda bulunmaktadır. Erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmektedir. Temelde ileri yaştaki erişkinlerin bir hastalığıdır. Yetişkinlerde düşük dereceli foliküler lenfomalar, çocuklarda ise yüksek dereceli diffüz lenfomalar daha sık görülür. İmmün sistemi baskılayan ilaçların kullanımının NHL riskini artırabileceği yönünde çalışmalar vardır (5).

Son zamanlarda promotör bölgelerdeki 5'-CpG adacıklarının hipermetilasyona uğrayarak, *p15<sup>INK4B</sup>* ve *p16<sup>INK4A</sup>* genlerinin alternatif olarak inaktive olduğu bulunmuştur. Bu GC bakımından zengin olan bölgeler normal dokuda metilasyona

uğramamış olarak bulunmaktadır. Metilasyona uğradıklarında genler transkripsiyonal sessizliğe uğrayarak inaktive olmaktadır.  $p15^{INK4B}$  genindeki metilasyona sıklıkla Akut Myeloblastik Lösemi (AML) ve Akut Lenfositik Lösemi (ALL) vakalarında rastlanması  $p15^{INK4B}$  geninin inaktivasyonunun bu lösemilerin patogenezinde muhtemel önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (6).

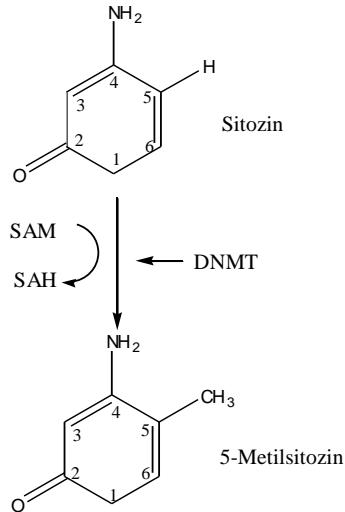
Farklı mekanizmaların  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$  genlerinin inaktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. NHL'larda homozigot delesyon ve mutasyonların insidansının düşük olduğu gözlenmiştir. Ancak lenfomalarda bu genlerin sıklıkla 5' CpG adacıklarında hipermetilasyonun oldukça sık olduğu gözlenmiştir. Bu hipermetilasyon genlerin transkripsiyonel represyonu ile korelasyon göstermektedir ve inaktivasyon mekanizmalarının bir alternatifini oluşturmaktadır.  $p15^{INK4B}$  genindeki metilasyon, lenfomaların belirlenmesinde bir hastalık markırı olarak iş görmektedir (7).

Bu çalışmada Non-Hodgkin lenfomalı (NHL) hastalarda  $p15^{INK4B}$  geninin promotor bölgesindeki metilasyon durumu metilasyona spesifik PCR ile araştırılmıştır. Çeşitli kanser türlerinde DNA metilasyonunun araştırılması son yıllarda üzerinde çok çalışmaların yapıldığı oldukça güncel bir konu olmakla beraber literatürde NHL'larda  $p15^{INK4B}$  genindeki DNA metilasyon durumunun araştırıldığı çok az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Ülkemizde de bu amaçla planlanmış veya yapılmakta olan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın literatüre katkısı yanında NHL vakalarında DNA metilasyonunun gösterilmesi, ileride olabilecek lenfoma gelişimlerinin erken teşhis edilebilmesine imkan sağlayacaktır. Ayrıca DNA metilasyonunun gösterilmesi hipometilasyon yapan ajanların kullanımını destekleyecektir. Böylece daha geniş ve muhtemelen daha etkin bir tedavi protokolünün uygulanması mümkün olacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu memeli genomunda meydana gelen epigenetik olaylarının en yaygını olup, ilk olarak 1948 yılında tanımlanmıştır. Epigenetik olaylar, gelişme ve hücre proliferasyonu sırasında gen dizisinde bir değişme olmaksızın, gen ekspresyon potansiyelindeki stabil değişiklik olarak tanımlanabilir. Bu değişiklik, kalıtsal olmamakla birlikte terapötik bir hedef için reversibldir (3,8). DNA metilasyonu başlıca DNA dizisindeki sitozin halkasının 5. konumundaki karbonuna bir metil grubunun kovalent olarak bağlanması ile oluşan bir modifikasyondur (Şekil 2.1). Sitozin metilasyonu olaylarının bir çoğu (% 70-80) 5'CpG3' (CpG dinükleotidleri) içeren dizilerde olmasına karşın bazı durumlarda CpA ve CpT dinükleotidlerinde de olmaktadır (9).



**Şekil 2.1.** DNA metilasyon mekanizması. Sitozinin karbon-5 pozisyonuna S-adenozilmetionin (SAM)'deki bir metil grubunun (CH<sub>3</sub>) transferini katalize eden DNA metiltransferazların (DNMT1, 3a ya da 3b) etkisi ile 5-metilsitozin meydana gelir (9).

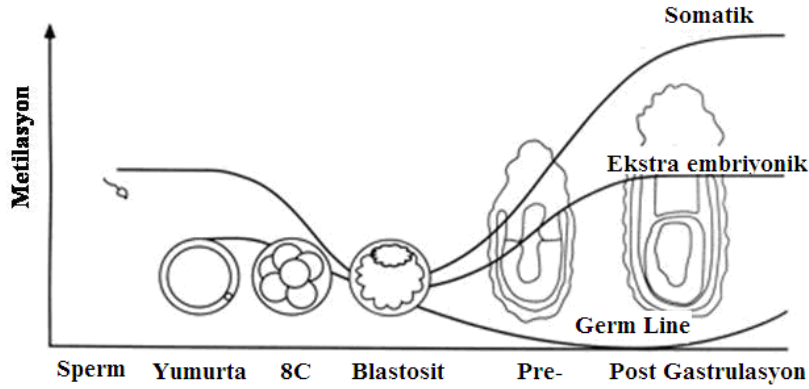


DNA'nın epigenetik olarak tekrar düzenlenmesi, çok farklı kanser türünde etiyolojinin aydınlatılması, kanser türüne özgü markır olabilecek genlerin belirlenmesi, tedaviye yönelik yeni yöntemlerin geliştirilmesi amacı ile son yıllarda artan oranlarda araştırılmaktadır. İnsan genomu uniform olarak metillenmez ve metillenmiş bölgelerin araya girdiği metillenmemiş bölgeleri de içermektedir. Genomun geri kalanın aksine DNA'nın CpG adacıkları olarak adlandırılan küçük bölgeleri 0,5-5 kb arasında değişen uzunluktadır. GC bakımından zengin bölgeler % 60-70 oranında bulunurlar. CpG adacıkları ortalama her 100 kb'da bir görülmektedir ve fonksiyonel genlerin 5' ucuna lokalizedir. Memeli genlerinin yarısında CpG dinükleotidlerinin bulunduğu tahmin edilmektedir. Diğer yandan CpG dizilerinin dışında CpNpG dizilerinin de yapılarında metil grupları taşıyabildikleri bildirilmiştir. Bu adacıklardaki CpG dinükleotidleri erişkin dokularda genellikle metilenmiş değildir ve DNA metilasyonun bu paterni bir jenerasyonundan diğerine geçişte stabil olarak kalıtılır. İnsan genomu yaklaşık olarak 30.000 CpG adacığı içerir ve bunların % 50-60'ı genellikle genlerin promotör bölgeleri ile ilişkilidir. Bunlar house-keeping genleri ile dokuya spesifik ekspresyon paternini de içermektedir (9,10). Memeli genomunda CpG dizilerinin 5 kat daha az oldukları ve bu durumun CpG yapısında bulunan 5-metil sitozinin (5-mC) fazla mutabl olmasından kaynaklandığı sanılmaktadır (11,12). DNA metilasyonunda S-adenozilmetiyonin (SAM) ve DNA metiltransferazlar (DNMT) önemli rol oynamaktadır. SAM bir çok metilasyon reaksiyonunun metil vericisidir. Artışı DNA metiltransferazları aktive eder, hipermetilasyonu tetikler ve global hipometilasyona karşı genomu korur (13,14). S-adenozil homosistein (SAH); metiltransferazların etkisiyle S-adenozilmetiyoninden oluşur (Şekil 2.2). SAM/SAH oranı metilasyon durumunun metabolik göstergesi olup metilasyon potansiyeli olarak da ifade edilir (1,15).



arttırmaktadır. Erişkin dokularda spesifik gen ekspresyonunun kontrolü için bir mekanizma olarak işlev gören CpG adacıklarındaki DNA metilasyonu, temel olarak iki küçük gen ailesinin restriksiyonu ile olmaktadır. İlk olarak kadınlarda X kromozomunun inaktivasyonu, inaktif X kromozomundaki CpG adacıklarının yaygın metilasyonu ile ilişkilidir. İkinci olarak, gen allelinin sadece paternal ya da maternal olarak katıldığı imprinte genlerde ekspresse edilmeyen allelin inaktivasyonu, genin promotöründeki metilasyon ile ilişkilidir. Normal dokularda genlerin çoğunluğu CpG adacıkları ile ilişkili olmakla birlikte bu adacıklar, genlerin ekspresse edilip edilmemesine bakılmaksızın metillenmeden kalırlar. Bu durum, CpG adacıklarındaki metilasyonun artmış olduğu insan kanser hücre serileri ile zıtlık göstermektedir (18).

Hayvan hücrelerinde gen ekspresyonunun baskılanmasında önemli bir fonksiyona sahip DNA metilasyonu günümüzde ölümcül hastalıkların başında gelen kanserin meydana gelmesinde ve tedavisinde de ön plana çıkmaktadır. Spesifik genlerde meydana gelen demetilasyona bağlı olarak hücre tipinde farklılaşmalara neden olmaktadır. Yine bu demodifikasyonun transkripsiyon-aktivasyon işlemi için önemli bir basamak olduğu kabul edilmektedir. Dokuya özgü aktif genler fonksiyonel oldukları dokuda hipometil, diğer dokularda hipermetil durumdadırlar. Dolayısıyla dokuya özgü house-keeping genler organizmanın yaşamı boyunca sürekli hipometil durumdadır. Yapılan araştırmalara göre, sperm ve ovum hücrelerinde çoğu gen bölgelerinin metillendiği, fakat 16 hücrelik morula basamağının hemen başında demetile edildikleri ve bu durumun blastula süresince devam ettiği anlaşılmıştır (Şekil 2.3) (19,20).



Şekil 2.3. Memeli gelişimi esnasında DNA metilasyonunda değişiklikler (20).

DNA metilasyonunun ökaryot canlılardaki rolünün ne olabileceği uzun süreden beri tartışılmaktadır. Prokaryotlarda olduğu gibi, konakçı hücre savunma mekanizması olarak yabancı DNA'ya karşı restriksiyon modifikasyon sisteminin bir parçası olarak görev yapmaktadır. Ayrıca ökaryotik hücrelerde epigenetik kalıtım kapsamında bir çok biyolojik olayların (somatik hücre farklılaşması, onkogenez, mutagenez ve yaşlanma gibi) yanı sıra;

- Kromozom paketlenmesi,
- DNA replikasyonu ve tamiri,
- Transkripsiyonun başlatılması,
- Çift heliks DNA stabilitesinin sağlanması,
- Genetik regülasyon,
- Nükleer parçalanmanın engellenmesi,
- X kromozom inaktivasyonu

gibi biyolojik düzenlenmelerde de görev alır (21,22).

### 2.1.1. DNA Metilasyonu ve Gen Regülasyonu

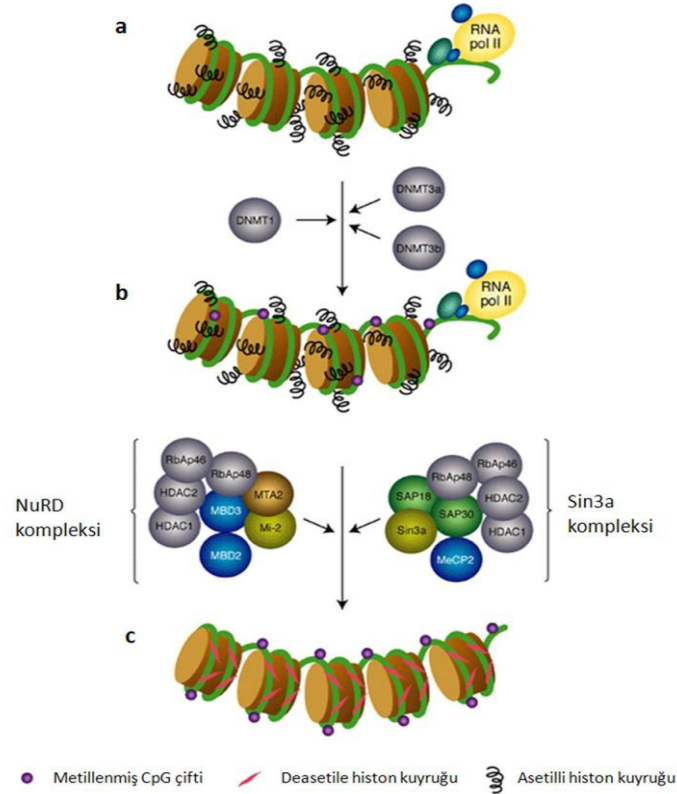
Ökaryotik gen ekspresyonunun regülasyonu kompleks bir işlemdir. Transkripsiyonun başlaması çok sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Cis-acting ve trans-acting faktörleri içeren olaylarla tamamlanmaktadır. Cis-acting elemanlar trans-

acting faktörler için substrat olarak rol oynayan DNA dizileridir ve DNA etrafında transkripsiyon için hazırlanırlar (23,24). Genin promotör bölgesindeki artmış metilasyon ekspresyonun azalmasına yol açarken, transkribe edilmiş bölgedeki metilasyon gen ekspresyonunda çeşitli etkilere neden olabilirler. DNA metilasyonu ile transkripsiyonel represyon için çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür (25).

İlk mekanizma; genin kendi promotöründe tanıma bölgelerindeki spesifik transkripsiyon faktörlerinin direkt bağlanmasını içermektedir. Bazı önemli transkripsiyon faktörlerinin bağlanması, onların tanıma bölgelerindeki metilasyona duyarlılık göstermektedir. Bununla birlikte bazı transkripsiyon faktörleri metilasyona karşı duyarsızdır ve diğer bir çoğu da tanıma dizileri içerisinde CpG bölgeleri içermez. AP-2, c-Myc/Myn, siklik AMP- bağımlı kinaz aktivatör CREB, E2F ve NFkB'yi içeren çeşitli transkripsiyon faktörleri CpG residüleri içeren dizileri tanır ve metilasyonla inhibe edilenlere bağlanır (25).

Represyonun ikinci şekli, metillenmiş DNA'daki spesifik transkripsiyonel represörlerin direkt bağlanmasını içerir (26). DNA metilasyonu, son yıllarda keşfedilen bir protein ailesi olan metil-binding domain (MBD) proteinleri olarak bilinen proteinlerin bağlanmasına yol açar. Bu protein ailesinin üyelerinin hepsinde, metillenmiş CpG bölgesi içeren DNA'ya spesifik olarak bağlanmasını sağlayan ortak metil bağlama bölgesi mevcuttur. Bu proteinlerin ilk tanımlananları MeCP1 ve MeCP2'dir. Bununla birlikte günümüzde çeşitli yeni proteinler de tanımlanmıştır. Bunlar, MBD1, MBD2, MBD4 ve Kasio proteinlerini içermektedir. MeCP1, MBD1, MBD2 ve MBD4, metil CpG binding domain olarak adlandırılan 5mCpG motifine bağlanır. Bununla birlikte Kasio farklı bir mekanizmaya sahiptir ve çinko parmak motifine bağlanır. MBD4, DNA onarımı ile ilişkilidir, ancak MBD1, MBD2 MeCP2 ve Kasio, histon deasetilat kompleksi ile etkileşerek hem in vitro hem de hücre kültüründe transkripsiyonu repress etmektedir. Bu protein ailesinin bilinen 5 üyesinden en az üç tanesinin (MeCP2, MBD2 ve MBD3), histon deasetilatlar (HDAC1 ve HDCA2) ve kromatin remodelling aktivitelerini (Sin3a ve Mi-2) içeren büyük protein kompleksleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Histon deasetilatlar ve kromatin-remodelling aktivitesinin etkisi ile kromatin yoğunlaşmasının meydana geldiği düşünülmektedir. Bu protein komplekslerinin diğer üyelerinin fonksiyonel rolü tam olarak açıklanamamıştır. Bunun yanı sıra MBD proteinlerinin, transkripsiyonel represyonu içeren çeşitli diğer

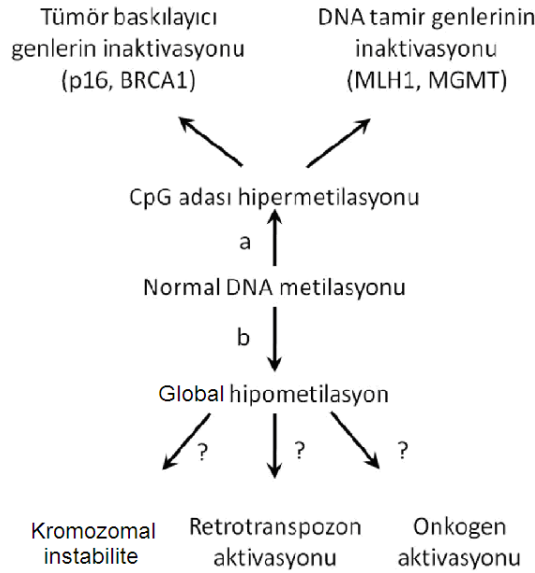
komplekslerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Şekil 2.4). Kokura ve ark. MeCP2'nin transkripsiyonel represyonda görev aldığı bilinen c-ski ve N-CoR proteinleri ile de interaksiyona girdiğini göstermişlerdir (9,27).



**Şekil 2.4.** DNA metilasyonunun transkripsiyonel represyona neden olmasına ilişkin önerilen mekanizma. (a) Transkripsiyonel olarak aktif kromatin predominant olarak metillenmemiştir ve yüksek oranda asetillenmiş histonlar içerirler. (b) CpG dinükleotidlerindeki metilasyon insan DNA metiltransferazları (DNMT1, DNMT3a 3b) ile olmaktadır. DNA yüksek oranda metillenir ancak hala asetillenmiş histonlar mevcuttur. (c) Metillenmiş DNA, MBD2 ve MeCP2 gibi metil binding domain (MBD) proteinleri için hedeftir ve proteinler NuRD (MBD2) ve Sin3a (MeCP2) kompleksleri gibi büyük protein kompleksleri ile ilişkili bulunurlar. Bu komplekslerdeki histon deasetilaz (HDAC1 ve 2) ve kromatin remodelling aktivitesi ile kromatin yapısında değişimler olur ve transkripsiyonel aktivasyona dirençli kromatin üretilir. Bu komplekslerdeki diğer komponentlerin fonksiyonel rolleri henüz bilinmemektedir. MTA2: metastaz ile ilişkili protein 2; RbAp46/48: retinoblastoma ilişkili protein 46/48; pol II: RNA polimeraz II; SAP18/30:sin3 ilişkili polipeptid 18/30 (9).

### 2.1.2. DNA Metilasyonu ve Kanser

Son zamanlarda kanserde DNA metilasyonu, moleküler araştırmaların ana konusunu oluşturmaktadır. Normal hücreslerle karşılaştırıldığında malignant hücresler, DNA metilasyonu açısından major değişimler göstermektedir (şekil 2.5). Hipometilasyon genellikle uzun araya girmiş diziler gibi tekrarlayan DNA elemanlarında olmasına karşın, hipermetilasyon CpG adacıklarında olmaktadır (9,28,29).



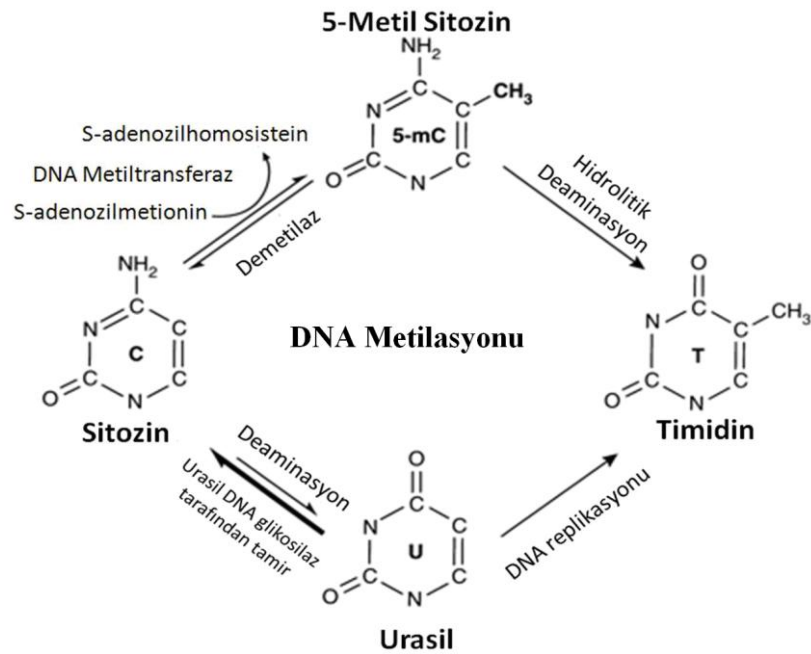
**şekil 2.5.** Artmış CpG adacıklarının muhtemel rolü ve tümör gelişiminde global DNA metilasyonunun azalması. (a) CpG artmış metilasyonu, tümör supresör ve DNA tamir genlerinin inaktivasyonuna yol açar. (b) Azalmış global DNA metilasyonunun rolü henüz bilinmemektedir. Bununla birlikte bu durumun, kromozom stabilitesini azaltma, retrotranspozon elemanlarının aktivasyonu (insersiyonel mutageneze yol açar) ya da onkogenlerin aktivasyonuna yol açtığı düşünölmektedir (9).

### 2.1.3. DNA Metilasyonunun Kanser Gelişimindeki Rolü

CpG dinökleotid yapısında yer alan 5-metilsitozin timine, sitozin ise urasile yaygın olarak deamine olmaktadır. Sitozinin→urasile transisyonu Urasil-DNA glikosilaz enzimi ile etkili bir şekilde tamir edilebilmektedir. Ancak DNA-MTaz, sitozin→urasil→timin transisyonunda bu tamiri bloke etmektedir. Kanserde bazlarda

meydana gelen bu transisyonel deaminasyon oranının çok yüksek olduğu bildirilmiştir. (Şekil 2.6) (8,30).

Nonmetil sitozinde meydana gelen mutasyon oranının mCpG yapısına göre çok daha az olduğu, mCpG dinükleotid yapısındaki mutasyon oranının metil grubu taşımayan moleküle oranla 40 kez daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan metil ya da non metil sitozinin invitro kültürasyonda invivo'ya oranla üç kez daha fazla deamine olduğu saptanmıştır. Bu durum, hücrede deaminasyonun geriye dönüşümlü tamir edildiğini, bununla ilgili olarak hücrede bir tamir mekanizmasının görev aldığını göstermektedir. Nitekim hücrede deaminasyonla meydana gelen urasil, eksizyonel tamir mekanizmasından uzaklaştırılmaktadır (Şekil 2.6) (8,31,32)



Şekil 2.6. DNA metilasyonundaki biyokimyasal yollar (8).

Bir hücrede mutasyonun meydana gelmesinde bir çok değişik faktörlerin etkisi vardır. Vücut tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin fazlalığı ve mevcut çevresel kirlenimler DNA'ya zarar vermektedir. Ancak şimdi kanser sürecinde metilasyonun da



majör bir rol oynadığına dair önemli deliller vardır. DNA metilasyonu olası mutasyonların artmasına, protoonkogenlerin aktivasyonuna, tümör supressör genlerin sessizleşmesine ve ayrıca kromozomal instabiliteye neden olmaktadır ( Şekil 2.7) (8).

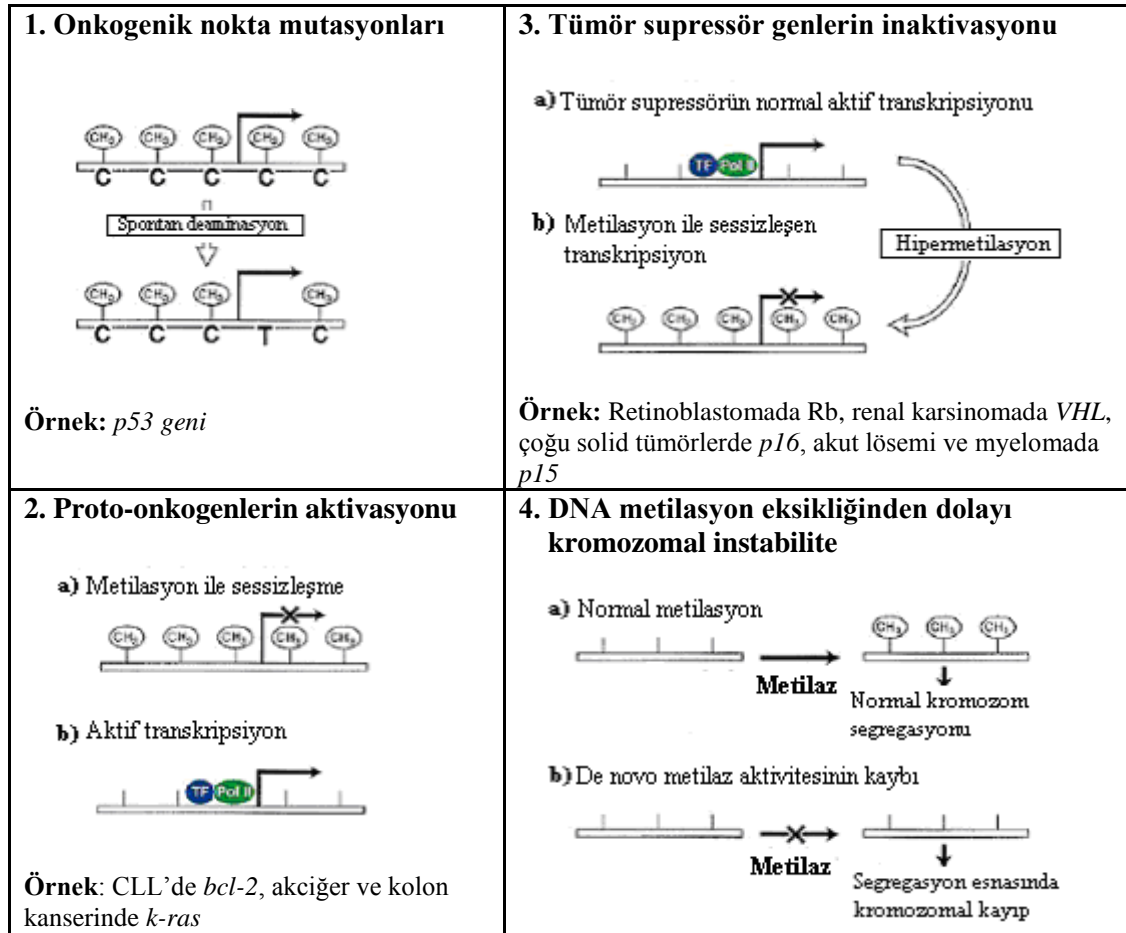
CpG dinükleotid yapısı nokta mutasyonları açısından DNA'nın sıcak bölgeleridir. İnsan tümörlerinde en sık nokta mutasyon bildirilen gen grupları *H-ras* ve *K-ras* onkogenleridir. Diğer yandan nokta mutasyon sonrası aktivitesinde önemli değişiklikler meydana gelen ve insan tümörleriyle paralel giden gen *p53* tümör supressör (TS) genidir. İnsan *p53* TS geni, yapısında 42 bp CpG nükleotidi bulunduran toplam 513 bp uzunluktadır. *p53* TS geninde binden fazla nokta mutasyon şekli bildirilmiştir. İnsanda *p53* TS gen yapısında görülen mutasyonlarının büyük çoğunluğu proteinin DNA'ya bağlandığı bölgeler olan kodon 120 ve kodon 290 arasında meydana gelmektedir. Dolayısıyla CpG dinükleotidleri genin toplam % 8.2'ni oluşturur. İnsanda çalışılan normal hücre tiplerinde CpG nükleotid çiftlerinin tamamının metillendiği saptanmıştır. Yine insan *p53* TS geninde transisyonel mutasyon oranının % 35 olduğu, gen yapısında transisyonel mutasyonlar dışında diğer tip mutasyonların da sıklıkla meydana geldiği bildirilmiştir (Şekil 2.7-1) (8,31,32).

Kanserin erken aşamasında sitozin metilasyonunda global bir azalma gösterilmiştir (hipometilasyon). Hipometilasyon, kromozomal instabiliteye ve bazı protoonkogenlerin ekspresyonunda artışa neden olmaktadır. Spesifik onkogenlerin insan tümörlerinde hipometillendiği gözlenmiştir. Hipometilasyon ve gen ekspresyonu arasındaki bu ters ilişki B-hücre kronik lenfositik lenfomada antiapoptotik *bcl-2* geninde, akciğer ve kolon karsinomalarında ise *k-ras* protoonkogeninde gözlenmiştir (Şekil 2.7-2) (8).

Normal bir şekilde metillenmemiş bölgelerde metilasyondaki artış, ilgili genlerin sessizleşmesine neden olmaktadır. CpG adacıklarındaki hipermetilasyondan dolayı belli kanserlerde bir çok tümör supressör geni eksprese edilememektedir. Retinoblastoma (Rb) tümör supressör geninde CpG adacıklarında hipermetilasyon saptanmıştır. Rb geninin promotör bölgesindeki invitro metilasyonun, promotör aktivasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir (Şekil 2.7-3) (8).

Spesifik kromozomal bölgelerin hipometilasyonunun, kromozomal instabiliteye neden olduğu düşünülmektedir. Kromozomal bölgelerdeki yeniden düzenlenmeler, kromozom fragmentlerindeki kazanç ve kayıptan dolayı anormal gen dozajlarının etkisi

sebebiyle hipometilasyon, malignensilere neden olmaktadır. Normal somatik hücrelerde kromozom 1 ve 16 üzerindeki perisentromerik heterokromatin bölgeler yoğun bir şekilde metillenmiştir. Göğüs adenokarsinomaları, ovaryum, epitelyal tümörler ve sporadik Wilms tümörlerinde bu bölgeler hipometillenmektedir (Şekil 2.7-4) (8,33).



Şekil 2.7. Kansere neden olabilen DNA metilasyonunun dört farklı mekanizması gösterilmiştir (8).

### 2.1.4. Hipermetilasyon

Kanserde hipermetilasyon hipometilasyona göre daha çok çalışılmıştır ve karsinogenezdeki rolü daha iyi bilinmektedir. İnsan tümörlerinde CpG adacıklarının

artmış metilasyonu ilk defa 1986'da rapor edilmiştir. Bununla birlikte son yıllarda PCR temelli analizler ile bu konu hakkında daha ayrıntılı bilgiler elde edilmiştir. Özellikle son 5 yıldır, tümör gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinen bir çok gen, metilasyon değişiklikleri açısından değerlendirilmiştir. Metilasyondan sorumlu olduğu düşünülen bu genler;

-Hücre siklusunun regülasyonu (*p16<sup>INK4A</sup>*, *p15<sup>INK4B</sup>*, *Rb*, *p14<sup>ARF</sup>*)

-DNA tamir sistemi (*BRCA1*, *MGMT(O(6)-metilguanin-DNA metiltransferaz)*)

-Apoptozis (*DAPK (ölümle-ilişkili protein kinaz)*, *TMS1(transmembran segmenti)*)

-İlaç direnci

-Detoksifikasyon

-Anjiogenez

-Metastaz gibi olaylardan sorumludur (Çizelge 2.1).

Tümör gelişimi sırasında CpG adacıklarının hipermetilasyonunun önemi epigenetik olarak vurgulanmıştır ve inaktivasyon, tümör oluşumu sırasında gen ekspresyonu kaybı için primer mekanizmadır. Glutasyon S-transferaz π (GSTP) enzimini kodlayan ve DNA'ya hasar veren maddelerin detoksifikasyonunda görev alan GSTP1 genidir. Prostat kanserinde bu proteinin ekspresyon kaybı, tümörlerin % 90'ından fazlasında gözlenmiştir. Hemen tüm vakalarda bu ekspresyon kaybının, GSTP1 promotöründeki hipermetilasyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Promotör hipermetilasyonu ve GSTP1 ekspresyonunun kaybı muhtemel prostat kanserinin gelişimindeki en erken basamaklardan biridir. Prostatik intra epitelial neoplazi (PIN) lezyonlarının büyük bir çoğunluğunda da görülmektedir. GSTP1 ekspresyon kaybı, oksidatif DNA hasarının artışına neden olmaktadır, bunun sonucu olarak da GSTP1'in detoksifikasyon aktivitesi kaybolmaktadır. Bu durum prostat tümörlerinin çoğunun başlamasında anahtar rol oynamaktadır (34-36).

Hipermetilasyon, lösemiler ve diğer hematolojik hastalıklarla da ilişkilidir. *Kalsitonin*, *p15<sup>INK4B</sup>*, *MDR* gibi bir çok genin çeşitli hematolojik malignensilerde hipermetilasyona uğradığı saptanmıştır. *Kalsitonin* ve *p15<sup>INK4B</sup>* geni, myelodisplastik sendromlu hastaların % 65'inde hipermetilasyona uğramıştır ve *p15<sup>INK4B</sup>* metilasyonunun azalmış yaşam süresi ve akut myeloid lösemiye tansformasyon ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Çizelge 2.1). Ayrıca *p15<sup>INK4B</sup>* metilasyonu, hastalık

progresyonunu da belirtmektedir. Bundan dolayı lösemik transformasyonun bir markırı olarak  $p15^{INK4B}$ 'nin kullanılması önerilmektedir (9,36,37)

**Çizelge 2.1.** Kanserde hipermetilasyon gösteren bazı genler (9).

Gen	Tümör gelişiminde fonksiyon kaybının etkisi	Tümör tipleri
Rb	Hücre siklusu kontrolünün kaybı	Retinoblastoma
MLH1	Artmış mutasyon oranı, ilaç direnci	Kolon, ovaryum, endometrial, gastrik
BRCA1	Genomik stabilite	Meme, ovaryum
E-CAD	Hücre motilitesinde artış	Meme, gastrik, akciğer, prostat, kolon, lösemi
APC	Atipik sinyal dönüşümü	Meme, akciğer, kolon, gastrik, özofagus, pankreatik, hepatoselüler
P16	Hücre siklusu kontrolünün kaybı	Bir çok tümör tipleri
VHL	Protein degradasyonunda değişim	Clear-cell renal karsinoma
P73	Hücre siklusu kontrolünün kaybı	Lösemi, lenfoma, ovaryum
RASSF1A	Atipik sinyal dönüşümü	Akciğer, meme, ovaryum, böbrek, nazofarinks
P15	Hücre siklusu kontrolünün kaybı	Lösemi, lenfoma, gastrik, squamoz, hücreli karsinoma, hepatoselüler
GSTP1	Artmış DNA hasarı	Prostat
DAPK	Azalmış apoptosis	Lenfoma, akciğer
MGMT	Artmış mutasyon oranı	Kolon, akciğer, beyin, özafagus, gastrik

APC:adenomatoz poliposis koli; BRCA1: meme kanseri; DAPK: ölümlle ilişkili protein kinaz; E-cad: epitelial kadherin; GSTP1: glutatyon-S-transferaz  $\pi$ -; MLH1: MutL1 homolog1; MGMT: O(6)-metilguanin-DNA metiltransferaz; p15 :  $p15^{INK4b}$ , p16 :  $p16^{INK4a}$ , Rb: retinoblastoma; RASSF1A: ras ilişkili domain ailesi 1A; VHL: von Hippel-Lindau

### **2.1.5. Kanserde Hipometilasyon**

Malignansilerin büyük bir bölümünde gözlenen metilasyon değişikliklerinin ikincisi hipometilasyondur. Metastatik hepatosellüler karsinoma, prostat tümörleri ve hematolojik malignansiler gibi solid tümörlerde yaygın olarak gözlenirler. Hipometilasyonun onkogen aktivasyonu, retrotransposon aktivasyonu ve kromozom instabilitesi gibi çeşitli mekanizmalarla geliştiği ileri sürülmektedir (38,39).

#### **2.1.5.1. Onkogen Aktivasyonu**

Hipometilasyon, çok sayıda genlerde primer kanserlerde bulunmuştur. CMYC ve HDAS gibi onkogenlerdeki hipometilasyon bilinmektedir. Hipometilasyon insan kanserlerinde MAGE, GAGE, CTAG/LAGE ve SAGE gen ailesinin büyük bir grubunun transkripsiyonel aktivasyonu ile ilgilidir. Bu gen aileleri, X kromozomu üzerinde lokalize olmuş durumdadır ve bunların hücrel fonksiyonları bilinmemektedir. MAGE genleri bu grubun öncü tipidir. Sitolik T lenfositleri tarafından tanınan tümör spesifik antijenler olarak kodlanan ve ilk keşfedilen genlerdir. MAGE tipi genler germline spesifik genlerdir. Bunlar spermatogonik hücrelerde metillenmemiş olarak bulunur. Fakat bütün yetişkin somatik dokularda metillenmiş haldedir. Bununla birlikte tümör gelişiminde bu genlerin rolü olmadığı gözlenmiştir. Ancak bu sonuçlar, DNA hipometilasyonunu takiben spesifik bir genin aktivasyonunun etkilendiğini göstermektedir (40,41).

#### **2.1.5.2. Retrotransposon Aktivasyonu**

İnsan genomu çok sayıda hareket edebilen mobil genetik elemanlar (retrotransposon) içermektedir. Bu elemanların ekspresyonu genellikle DNA metilasyonu ile suprese edilmektedir. Bununla birlikte insan kanserlerinde, hipometilasyon ve sonuçta bu elemanların ekspresyonunun yeniden aktive olması saptanmıştır. Bu durum potansiyel olarak retrotransposonların hareketine sebep olur ve

genomda yeni bir bölgeye yerleşmesi insersiyonel mutagenize yol açar. Bununla birlikte bu mobil genetik elemanların insersiyonundan kaynaklanan bir mutasyon da olmasına rağmen bu mutasyonlar sık gözlenmez ve tümör gelişiminde bu gibi insersiyonel mutasyonların majör bir rol oynadıkları tartışmalıdır (42,43).

### **2.1.5.3. Kromozomal İnstabilite**

Kromozom aberasyonları kanserde oldukça fazladır ve DNA metilasyonunun, kromozom stabilitesinin kontrolünü etkilediği ileri sürülmektedir. Lengauer ve ark. kolon kanseri hücre serilerinin metilasyon kapasitelerinin farklılık gösterdiğini ve bu durumunda hücre serisinde gözlenen yoğun anoploidi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, bu hücre serilerinde gözlenen kromozom instabilitesi temel alınarak metilasyon defektlerinin saptanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu veriler altında, DNMT'lerin (DNMT3b) mutasyonun neden olduğu otozomal resesif ICF sendromunda (immün yetmezlik, sentromer instabilitesi ve yüz anomalileri) demetilasyon ve 1, 9 ve 16. kromozomlarda perisentrik heterokromatik bölgede instabilite gözlenmektedir. Ayrıca 1. ve 16. kromozomda bu bölgelerdeki instabilite ve hipometilasyon ovaryum, meme ve Wilms tümöründe de gözlenmiştir. Bununla birlikte genomik hipometilasyon ve kromozom instabilitesine ilişkin net veriler mevcut değildir ve ICF sendromlu hastalarda tümör sıklığında bir artış rapor edilmemiştir (44-46).

### **2.1.6. CpG Adacıklarının Geniş Skalalı Metilasyon Analizi**

Bugüne kadar CpG adacıklarının metilasyonuna ilişkin yapılan çalışmaların hemen hepsinde, metilasyon için hedeflenen tanımlanmış genler ve aday genler kullanılmıştır. Metilasyonlu CpG adacıkları içeren sessiz genlerin uzun bir listesi tanımlanmış olmasına rağmen, kanserde CpG adacıklarının gerçek boyutunun saptanması, seçilmemiş CpG adacıklarının geniş skalalı değerlendirilmesini gerektirmektedir. Bu tür çalışmalar için günümüzde kullanılan teknikler şunlardır;

İlk olarak, Huang ve ark. bir hibridizasyon tekniğini, metilasyona spesifik restriksiyon enzimi ile kombine ederek mikroarray temelli bir teknik geliştirmişlerdir ve bu teknik ile simultan olarak binlerce CpG adacığının görüntülenmesini sağlamışlardır. Bu teknik, meme kanserinde CpG adacıklarının fazla oranda metillenmesini açığa çıkarmada kullanılmaktadır ve tümör derecesiyle metilasyon korelasyonu da bu yöntem ile gösterilmektedir (47).

İkinci olarak, Costello ve ark. restriksiyon noktası genomik görüntüleme (restriction landmark genomik scanning; RLGS) tekniği olarak bilinen iki boyutlu jel elektroforezi tekniğini temel alarak geliştirdikleri bir teknikle, multipl tümör tiplerinde 1000'den fazla CpG adacığının analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu teknik ile, çeşitli tümör tiplerine spesifik metilasyon olayları da dahil olmak üzere farklı tümör tiplerinin ortak metilasyon paternini tespit etmişlerdir. Bu yöntem temel alınarak ve insan genomunda yaklaşık 30.000 CpG adacığı olduğu varsayılarak araştırmacılar, tek bir tümörde yaklaşık 3000 (ortalaması 400) metilasyona uğramış CpG adacığı olduğunu saptamışlardır (48).

Metilasyonun tümör-spesifik paterninin tanımlamasına ek olarak RLGS tekniği, farklı tümör tiplerinde DNA metilasyonu için yeni hedef bölgeler tanımlamıştır. Örneğin medullablastomada ilgili lokustaki metilasyonun durumu hastanın prognozu ile ilişkilidir. Bununla birlikte tümör gelişiminde önceden belirlenmiş genlere odaklanan aday gen çalışmalarının aksine, geniş skalalı analizler ile yeni metilasyon hedefleri saptanmış olacaktır. Bu durum özellikle tek bir tümörde bulunan fazla sayıda CpG adacığının saptanması açısından önemlidir ve bu da atipik metilasyonlu bir çok lokusun tümör gelişiminde önemli rol oynayamayacağı anlamına gelmektedir (49-52).

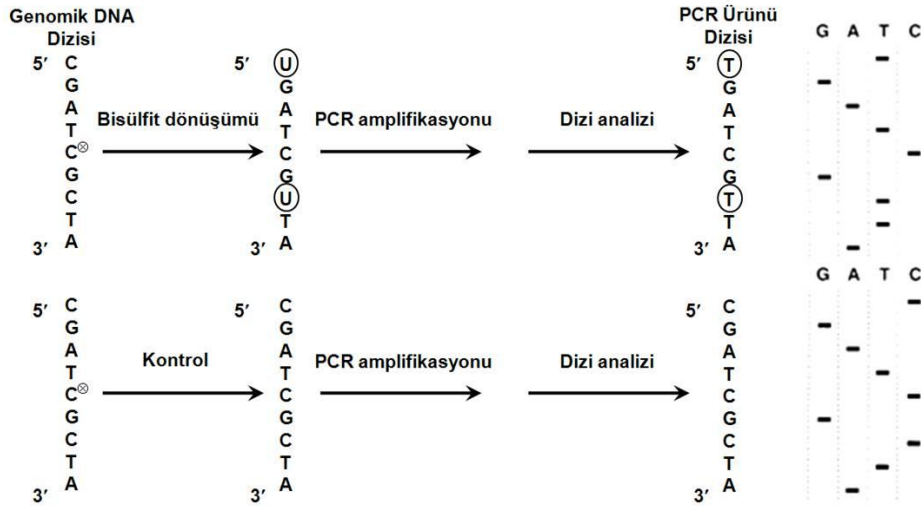
DNA metilasyon analizlerinde çok sık kullanılan bir diğer teknik Southern blot yöntemidir. Bu metodda, genomik DNA aynı dizi için spesifik metilasyon-spesifik ve metilasyona-spesifik olmayan endonükleazlarla kesilir (*Hpa I* ve *MspII* gibi). Potansiyel olarak metilenmiş CpG adacıkları için hedef dizinin analizi, uygun restriksiyon enzimlerinin seçilimini izler. Daha sonra restriksiyon fragmentleri, agaroz jel üzerinde ayrılırlar, ayrılan bu fragmentler bir membrana transfer edilir ve hedef dizi için spesifik bir proba hibridize edilir. Otoradyografi ile boyutları tahmin edilen bandların varlığı gösterilir. Bunu hedef dizideki metilasyonlarının değerlendirilmesi izler. Southern

hibridizasyon metodu için yüksek moleküler ağırlıklı büyük miktarlarda DNA gerekmektedir (53).

Restriksiyon enzim PCR yönteminde ise, genomik DNA metilasyona spesifik ve metilasyona spesifik olmayan restriksiyon enzimlerle bağlanır ve sindirilen DNA, hedef bölge primerler kullanılarak amplifiye edilir. Hedef dizi metillenmiş CpG alanlarını içeriyorsa amplifiye DNA'nın boyutu tahmin edilebilir. PCR'dan önce metilasyona spesifik olmayan endonüklezların kullanımı ile hedef DNA dizisinin metilasyon bölgesi önemsenmezse olası amplifikasyon gerçekleşmeyecektir. Bu yöntemde enzim sindirimi tam olarak gerçekleştirilmelidir. Metillenmiş ve metillenmemiş hedef bölgede CpG alanları varsa, yetersiz sonuçlar elde edilecektir. Ama yine de bu teknik hedef dizide DNA metilasyonunun izlenmesinde çok önemlidir (53).

Bisülfid DNA dizi analizi, 5-metilsitozin içeren DNA dizileri için genlerin metilasyon durumlarının analiz edilmesinde yeni tekniklerin gelişmesine neden olmuştur. Bu yöntem, ilk olarak Frommer ve ark. tarafından tanımlanmıştır. Bisülfid DNA dizi analizindeki amaç genomik DNA'daki 5-metilsitozinin belirlenmesi esasına dayanır. Sodyum bisülfid ile tek zincirli DNA'da, 5-metilsitozin değişmeden kalırken bütün sitozinler urasile deamine olur. Hedef dizi daha sonra, spesifik primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edilir. Amplifiye olmuş DNA dizisindeki bütün urasil ve timin residüleri timin olarak saptanırken sadece 5-metilsitozin residüsü değişmeden kalır (Şekil 2.8). Bisülfid dönüşümünün tamamlanması oldukça önemlidir. Çünkü metillenmiş CpG adacıklarına komşu sitozin bisülfid uygulamasına direnç gösterebilir (8,53).





**Şekil 2.8.** Genomik dizide bisülfid değişimi ile sitozin metilasyonunun belirlenmesi (8).

Metilasyon spesifik PCR (MSP) yöntemi, ilk defa Herman ve ark. tarafından tanımlanmıştır. MSP, DNA metilasyon analizinde yaygın olarak kullanılan metotlardan biridir. Bisülfid uygulamasından sonra, metilenmiş ve metillenmemiş DNA arasındaki mevcut dizi farklılıklarından yararlanılarak yapılmaktadır. Sitozinler, urasile deamine olur ve sitozinler PCR sırasında timin gibi replike olur. Primerlerin yerleşimi, özellikle ya metilenmiş (C) ya da modifiye (T) alanları içeren dizilerde olur. PCR sonrası, amplifiye edilmiş olan DNA, metilenmiş ya da metillenmemiş diziler için spesifik primer çiftiyle elde edilir. MSP, DNA'nın bir bölgesindeki metilasyonun varlığının saptanmasında kullanılan hızlı ve kaliteli bir metoddur. Primerlerin dikkatli seçilmesi çok önemlidir. Çünkü metil ve unmetil primer çiftlerinin her ikisi ile yanlış pozitif sonuç elde edilebilir. Genomik DNA'nın tamamlanmamış bisülfid modifikasyonu, metilenmiş sitozin için yanlış pozitif sonuç vermesine neden olabilir (53).

Metilasyona-hassas tek nükleotid primer uzaması, anormal allellerde mutasyonun belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bisülfid uygulaması ve modifiye DNA için spesifik primerler ile hedef dizinin amplifikasyonundan sonra, amplifiye DNA metilasyona hassas tek nükleotid primer uzama reaksiyonu için bir kalıp olarak kullanılır. Tek nükleotid uzaması reaksiyonunda kullanılan primerler, metilasyon

bölgesini tanıyan bağlama bölgesinden sadece bir nükleotid öncesine göre dizayn edilmektedir. Saflaştırılmış amplifiye DNA radyoaktif dCTP ya da dTTP ve DNA polimeraz ile inkübe edilir. Eğer hedef bölge metillenirse, bir sitozin (C) nükleotid uzaması sırasında birleştirilmektedir. Eğer bölgede metillenme yoksa, sitozin yerine timin (T) birleştirilir. Primer dizaynı ve DNA'nın tam modifikasyonu, yapılan analizlerde iyi sonuçlar elde edilmesi için önemlidir (53).

### **2.1.7. Kanser Erken Tanısında DNA Metilasyonu**

CpG adacıklarının artmış metilasyonu, kanserin erken tanısı için geliştirilen teknikler arasında en cazip markıdır. DNA metilasyonunun 3 anahtar özelliği, bu amaç için kullanılacak en iyi tümör markırı olduğunu göstermektedir. İlk olarak kanserde bir çok CpG adacığında metilasyon oranı artmaktadır. Ancak normal dokularda bu oran çok nadirdir ya da hiç metillenme olmaz. İkinci olarak, gen içerisinde bir çok noktada meydana gelebilecek olan genetik mutasyonun aksine DNA metilasyonundaki değişimler, genin bir çok spesifik noktasında meydana gelen transkripsiyon kaybı ile ilişkilidir. Üçüncü olarak, PCR temelli tekniklerin gelişimi ile (özellikle metilasyona spesifik PCR), serum ve tükürük gibi çok küçük miktarlarda sıvılardan izole edilen tümör kaynaklı DNA örneklerinde, metilasyon bozuklukları çok kısa sürede saptanabilmektedir. Hastaların serumunda tümör kaynaklı DNA'nın ekstrakte edilmesi, çeşitli tümör tiplerinde (kolon, baş, yanak ve akciğer kanserleri gibi) tümöre spesifik metilasyon değişikliklerini başarılı bir şekilde tanımlanmasını sağlamaktadır. Ayrıca çeşitli tümör tiplerindeki metilasyon anomalileri, prostat kanseri için sperm, meme kanseri için duktal lavaj ve baş-yanak kanserleri için tükürük gibi belirli örneklerden izole edilen tümör-spesifik DNA örneklerinin kullanımı ile saptanabilmektedir (54,55).

Bu uygulamanın potansiyel bir problemi, yaşa bağlı metilasyon olasılığıdır. Yapılan çalışmalarda, östrojen reseptör geni ya da IGF2 (insulin-like growth factor 2) gibi birçok genin promotör metilasyonunun, normal dokularda saptandığı ancak bu metilasyonun yaşla birlikte arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte tüm genler, yaşla ilişkili metilasyon şüphesi göstermemektedir (56,57).

## 2.1.8. DNA Metilasyonu ve Yeni Terapötik Stratejiler

Kanser gelişimi ile ilgili çok sayıda hedef gen, aberant DNA metilasyonu ile inaktive olmaktadır. Bu prosesin inhibitörleri kanser terapisinde potansiyel olarak ilgi çekmektedir (Çizelge 2.2) (53).

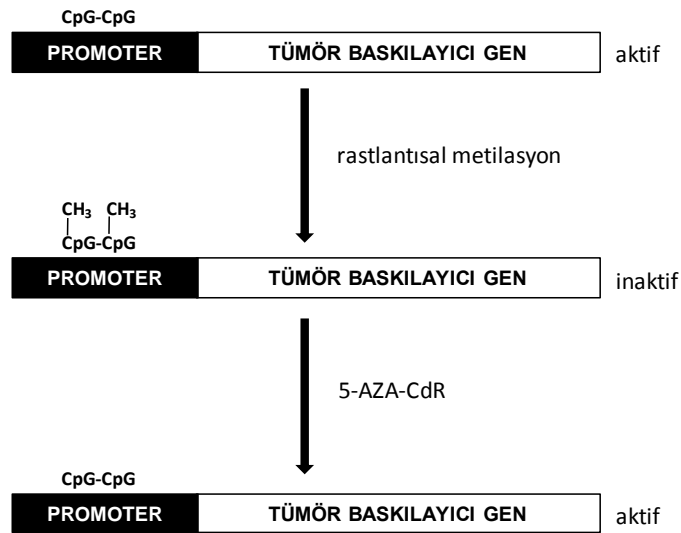
**Çizelge 2.2.** Aberant DNA metilasyon ile sessizleşen genler ve insan tümör hücre serilerinin 5-aza-2'-deoksisitidin ile aktivasyonu (53).

Gen	5-Aza-2'-deoksisitidin aktivasyonu	Referans
<i>Tümör Supressör</i>		
<i>p15<sup>INK4B</sup></i> (siklin kinaz inhibitörü)	+	Herman ve ark.,1996
<i>p16<sup>INK4A</sup></i> (siklin kinaz inhibitörü)	+	Otterson ve ark., 1995; Merlo ark.,1995
<i>p73</i> (p53 homoloji)	+	Corn ve ark.,1999
ARF/INK4A	+	Robertson ve Jones., 1998
Wilms Tümör	+	Laux ve ark., 1997
von Hippel Lindau(VHL)	+	Herman ve ark., 1994
Retinoik asit reseptör- $\beta$ (RAR $\beta$ )	+	Côté ve Momparler, 1997; Côté ve ark., 1998
Östrojen reseptörü	+	Ferguson ve ark., 1995
Androjen reseptörü	+	Jarrard ve ark., 1998
Mammary-derived growth inhibitör	+	Huynh ve ark., 1996
Hipermetylated in cancer (HIC1)	yapılmadı	Ahuja ve ark., 1997
Retinoblastoma	yapılmadı	Ohtani-Fujita ve ark., 1993
<i>Invasyon/metastazis supressör</i>		
E-cadherin	+	Graff ve ark., 1995
TIMP-3	+	Bachman ve ark., 1999
mts-1	+	Tulchinsky ve ark., 1995
CD-44	+	Verkaik ve ark., 1999
<i>DNA tamiri/detoksifiye karsinogenler</i>		
Metilguanin metiltransferaz	+	Qian ve Brent., 1997
hMLH1	+	Herman ve ark., 1998; Deng ve ark., 1999
Glutatyon S-transferaz	yapılmadı	Etseller ve ark., 1992; Millar ve ark.,1999
BRCA-1	yapılmadı	Dobrovic ve Simpfendorler, 1997; Mancini ve ark., 1998
<i>Anjiogenezis inhibitörü</i>		
TSP-1(Trombospondin-1)	+	Li ve ark., 1999
TIMP3	+	Bachman ve ark., 1999
<i>Tümör antijen</i>		
MAGE-1	+	Weber ve ark., 1994; Coral ve ark., 1999

Genetik modifikasyonlardan farklı olarak epigenetik değişimler geri dönüşümlüdür. Çeşitli klinik denemelerde, azasitin, histondeasetilaz inhibitörleri ve

fenil bütirat gibi terapötik ajanların hematolojik ve solid tümörlerde suskun genleri tekrar aktif hale getirdiği gösterilmiştir. Metilasyonu hedefleyen ve yaygın olarak kullanılan ajanlar; azasitidin (5-azasitidin), desitabin (5-aza-2'deoksisitidin) ve dihidro-5-azasitidin'dir. Deoksisitidin türevleri olan bu ajanlar, pirimidin zincirinin 5. pozisyondaki bazı modifikasyonlarla meydana gelmişlerdir. Diğer ajanlar zebularin ve antisense oligonükleotidler içermektedirler (3).

5-aza-2'-deoksisitidin, DNA metiltransferazın etkili ve spesifik bir inhibitörüdür. Aberant metilasyon ile suskunlaşan tümör supressör genlerin 5-aza-2'deoksisitidin ile aktivasyonu şekil 2.9'da gösterilmiştir (53).



**Şekil 2.9.** Tümör supressör geninin promotör bölgesinin tesadüfi metilasyonu ile ekspresyonunun inaktivasyonunu gösteren model. 5-aza-2'-deoksisitidin tedavisi ile gen ekspresyonu yeniden aktive olmaktadır (53).

5-aza-2'deoksisitidin, hücre diferansiyasyonunu da indüklemektedir ve bu nedenle çok sayıda hematopoyetik hastalığın tedavisinde de kullanılmaktadır. Klinik denemeler, solid tümörlerde 5-aza-2'deoksisitidine yanıtın % 10'dan daha az olduğunu göstermiştir. Ancak hematolojik malignansilerde daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Kanserde 5-aza-2'deoksisitidin kullanımı, toksik etkisinden dolayı sınırlı olmakla birlikte diğer ilaçlarla birlikte kombine olarak kullanılmaktadır (9,53).

Histon deasetilazların aktivitesi de, metillenmiş dizilerin transkripsiyonel represyonunda oldukça önemlidir (9).

DNA metilasyonunu inhibe etmede kullanılan bir diğer yöntem, antisense oligonükleotid kullanımınıdır. DNMT1 mRNA'ya karşı direkt olarak kullanılan antisense oligonükleotidler, DNMT1 protein düzeyinde azalmaya neden olmakta, insan tümör hücrelerindeki *p16<sup>INK4A</sup>* tümör supressör geninin ekspresyon ve demetilasyonunu indüklemekte aynı zamanda fare modelinde tümör büyümesini inhibe etmektedir. Bu molekül, Faz I klinik denemelerinde kullanılmaktadır ve bu molekülün antitümör aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Gelecekte bu ajan baş ve yanağın skuamoz karsinoması ile renal hücre karsinomasında da kullanılacaktır (9).

## 2.2. Lenfoma

Lenfomalar, lenfoid doku kökenli hücrelerin yani lenfositler, makrofajlar, bunlardan türemiş olan hücrelerin malign neoplazileridir. Yani bu kanserler vücudumuzdaki bağışıklık sistemi elemanlarının anormal çoğalması sonucu gelişir. Lenf sistemi bağışıklık sisteminin bir parçasıdır ve vücudun hastalıklar ve enfeksiyonlarla savaşmasına yardımcı olur. Lenfatik sistem ince lenf damarlarının oluşturduğu ve kan damarları gibi dokulara ulaşan ve bütün vücudu saran bir ağ oluşturmaktadır. Lenf damarları renksiz bir sıvı olan lenf sıvısı taşır. Lenf sıvısı enfeksiyonlarla savaşan ve lenfosit adı verilen hücreler içerir. Bu damarlar ağı içinde lenf bezleri adı verilen küçük organlar mevcuttur. Lenf bezleri kümeler halinde, başlıca koltuk altı, kasıkta, boyunda, göğüste ve karında bulunurlar. Dalak, timus, bademcikler ve kemik iliği de lenf sisteminin birer parçasıdır. Lenf dokusu ayrıca mide, barsaklar ve deri gibi bedenin diğer bölümlerinde de bulunur (58).

İki geniş lenfoma türü vardır:

1. Hodgkin Lenfoma (HL)
2. Non-Hodgkin Lenfoma (NHL)

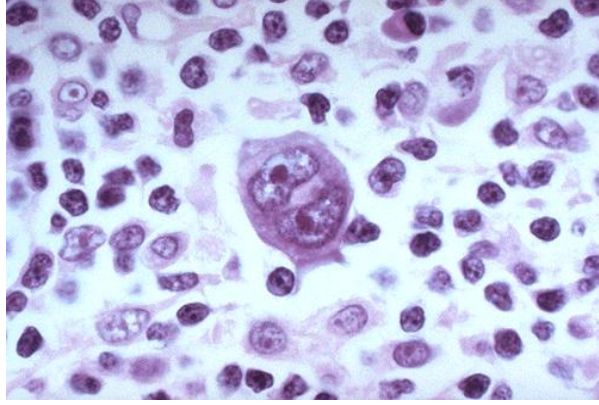
Genel olarak lenfomaların % 60'ını NHL, % 40'ını HL oluşturur.

### 2.2.1. Hodgkin Lenfoma

Hodgkin lenfoma (HL), 1832 yılında Sir Thomas Hodgkin tarafından tanımlanmıştır. Primer olarak lenfoid dokularla ilişkilidir. Hemen hemen her zaman bir tek gangliyondan ya da ganglion zincirinden kaynaklanır ve karakteristik olarak anatomik açıdan ilişkili ganglionlara yayılır. Lenfomaların her iki tipide lenfoid dokudan köken almasına rağmen, hodgkin lenfomalarda retiküloendotelial hücrelerin bir grubu olan histiyositlerde anormal bir farklılaşma görülür. Histiyositler anormal derecede büyümüştür. Lenf nodlarında normal hücrelerin yerini alan bu hücrelere “Reed-Stenberg hücreleri” adı verilir (Şekil 2.10). Hodgkin lenfomanın Rye sınıflamasına göre dört alt tipi vardır:

- 1) lenfosit baskınlığı, 2) mikst sellülarite, 3) lenfositten fakirlik, 4) nodüler skleroz.

Hodgkin hastalığının histolojik tanısında mutlaka aranılan şart Reed-Stenberg (RS) hücresidir. Fakat bu her ne kadar gerekli olsada Hodgkin hastalığı için spesifik değildir. Çünkü bu hücreye, bazen enfeksiyöz mononükleoz, mikozis fungoides ve nadiren NHL’larda ve diğer başka hastalıklarda da rastlanmaktadır. RS hücresi geniş, genellikle hafif eozinofilik bir sitoplazmaya sahiptir ve çapı 15-45 nm arasında değişmektedir. Bu hücre ya multilobüler bir nükleusa sahip olmasıyla ya da büyük yuvarlak belirgin nükleollere sahip bir multinükleer bir hücre olması ile ayırt edilir. Asıl karakteristik özelliği ise, çevresinde berrak bir alan bulunan, büyük asidofilik bir nükleole sahip, birbirinin ayna görüntüsü olan iki adet nükleusu olmasıdır. Nükleer membran belirgindir. Tedavi seçiminin ve prognozun hastalığın yayılımı ile yakından ilişkili olduğu için hodgkin lenfomada evreleme çok büyük bir klinik öneme sahiptir (59,60).



**Şekil 2.10.** Hodgkin Lenfoma'nın karakteristik Reed-Stenberg hücresi ve onu çevileyen mononükleer varyantlar (59).

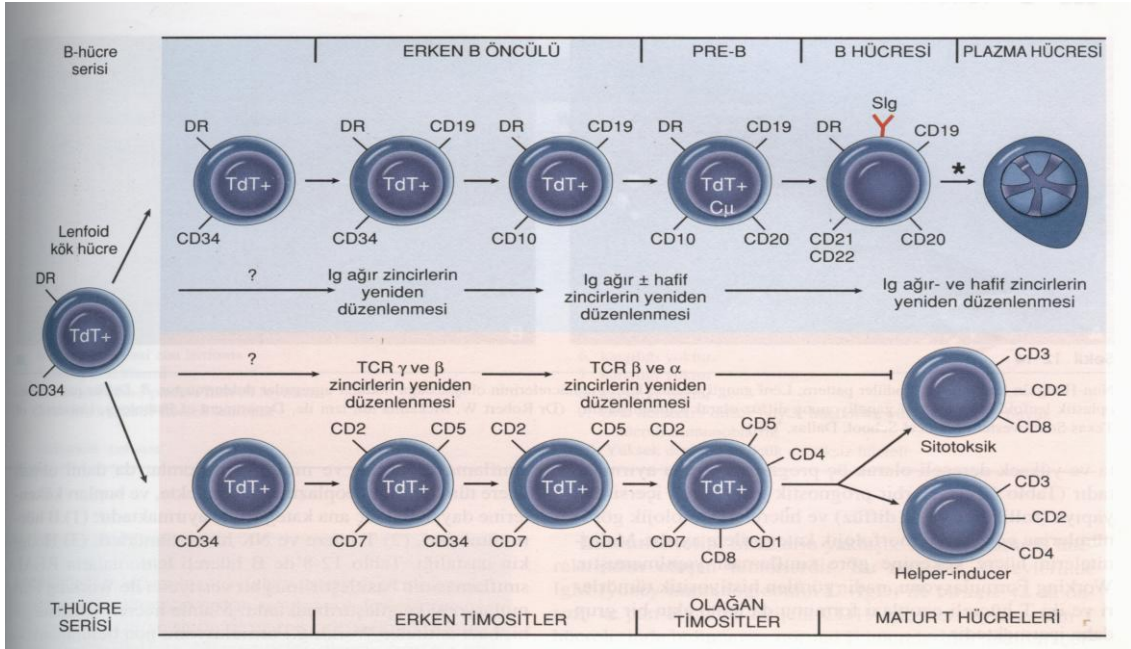
### **2.2.2. Non-Hodgkin Lenfoma**

Non-Hodgkin Lenfomalar, lenfoid dokudan köken alırlar ve genellikle lenf ganglionlarında (% 65) ya da daha az sıklıkla parenkimal organların lenfoid dokularında (% 35) gelişirler. NHL, biyolojik, morfolojik, klinik ve genetik özellikleri farklı olan tümörlerin heterojen bir grubunu oluşturur (59,60).

Bütün tiplerinin, lenf ganglionlarına ve vücuttaki diğer organlar özellikle karaciğer, dalak ve kemik iliğine yayılma potansiyeli bulunmaktadır. Bazı vakalarda, kemik iliği tutulumunun ardından proliferen hücreler periferik kana yayılarak lösemi benzeri bir tabloya neden olurlar. Kemik iliğinden köken alan lenfoid hücrelerin lösemisi ise lenf ganglionlarını infiltre ederek lenfoma benzeri bir histolojik görünüme yol açabilirler. Bu nedenle bazı vakalarda lenfoid lösemi ve NHL arasındaki ayrım oldukça zordur (59).

Bütün immün sistemler gibi NHL'lar da T hücrelerinden, B hücrelerinden ya da histiyositlerden köken alır. Tümörün kaynaklandığı hücre tipi, genellikle tümör hücrelerinin fenotipik ve moleküler özelliklerine dayanarak saptanır. NHL'ların çoğu B hücre kökenlidir, geri kalanın büyük bir kısmı ise T hücre tümörleridir. Histiyosit ve makrofaj kaynaklı tümörler oldukça nadir görülür. T ve B hücre diferansiyasyon aşamalarından birinde kalmış olan hücreleri içerirler (Şekil 2.11). Bu şekil aynı zamanda T ve B hücreleri arasında ayrım yapabilmeyi sağlayan, tümörlerin alt

gruplamasının yapılmasında da yararlı olabilecek genotipik ve fenotipik özellikleri de göstermektedir. CD2, CD3, CD4, CD7 ve CD8 T hücrelerini ve bu hücrelerin tümörlerini tanımda yararlıdır. CD10, CD19, CD20 ve yüzey immunoglobülin (Ig) ise B hücre belirleyicileridir. Bunlara ek olarak CD16 ve CD56 NK hücre belirleyicileri iken, CD13, CD14, CD15 ve CD64 myeloid hücre antijenleridir. CD34 pluripotent kök hücrelerinde eksprese edilir ve en erken dönem lenfoid ve myeloid öncü hücrelerde bulunur (Şekil 2.11) (59).



**Şekil 2.11.** B ve T hücre diferansiasyonunda meydana gelen fenotipik ve genotipik değişikliklerin şematik resmi. Bazı CD4+ CD8+ olup (olağan timositler) aynı zamanda CD3'de eksprese eden hücreler gösterilmiştir. CD; cluster designation (grup işareti); TdT, terminal deoksinükleotidil transferaz; Ig; immunoglobülin; TCR, hücre reseptörü; DR, HLA-sınıf II antijenleri (59).

### 2.2.3. NHL'ların Sınıflandırılması

Lenfomalar, bugüne kadar sınıflaması en sık değişen neoplazmaları oluşturur. 1966 yılında Rapaport, 1974 Lukes/Collins, 1982 Working Formulation, 1994 Yenilenmiş Avrupa-Amerika Lenfoid Neoplazm (R.E.A.L) ve 2001 World Health Organization (WHO) sınıflaması en çok adından söz edilen sınıflamalardır (61).



### **2.2.3.1. Yenilenmiş Avrupa-Amerika Lenfoid Neoplazm (REAL) ve World Health Organization (WHO) Sınıflaması**

1994'te REAL sınıflamasında lenfoid maligniteler morfolojik, immünolojik ve genetik tekniklerle B-hücreli, T hücreli ve Hodgkin hastalığı olarak 3 kategoride tanımlanmıştır. 2000 yılında WHO sınıflaması lenfomaları gelişmiş morfolojik ve immünolojik ve genetik tekniklerle B-hücreli ve T-hücreli olarak yeniden tanımlanmıştır. WHO sınıflaması, dünyada hematopatoloji ve klinik onkoloji konusunda deneyimli otörlerin morfolojik, klinik, immunolojik ve genetik verileri dikkate alarak oluşturdukları konsensus sonucu ortaya konmuş ve halen geçerliliğini sürdüren son sınıflamadır (61).

### **2.2.3.2. Working Formulation (WF)**

Bu sisteme göre lenfomalar klinik ve biyolojik özellikleri farklı olan üç grupta toplanmışlardır; WF en yaygın kullanılan sınıflandırmadır. İmmünolojik tiplendirme dikkate alınmamıştır. Hücrelerin morfolojik özelliklerine dayanır (61,62).

#### **I- Low grade (Düşük dereceli)**

A-Küçük lenfositik

B-Foliküler, küçük çentikli hücre hakimiyeti

C-Foliküler, küçük çentikli ve büyük, karışık hücreli

#### **II. Intermediate grade ( Orta dereceli)**

D-Foliküler, büyük hücre hakimiyeti

E-Diffüz, küçük çentikli hücreli

F-Diffüz, küçük çentikli ve büyük, karışık hücreli

G-Diffüz, büyük hücreli

#### **III. High grade (Yüksek dereceli)**

H-Büyük hücreli, immünoblastik

I-Lenfoblastik

J-Küçük çentiksiz hücreli Burkitt ve Burkitt dışı

### 2.2.3.3.Histopatolojik Sınıflandırma

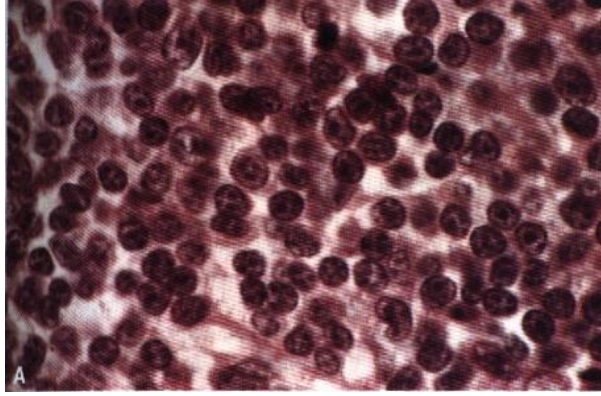
Non-Hodgkin lenfomanın sınıflandırılmasında hastalığın 3 esas özelliği vurgulanmıştır. Lenfomanın mikroskop altındaki incelemelerine (morfoloji), hücreler tarafından taşınan yüzey markırlarına (immünoloji), lenfoma hücrelerindeki mevcut kromozomal değişimlere göre (sitogenetik) (59).

### 2.2.4. NHL Tipleri

#### 2.2.4.1. Küçük Lenfositik Lenfoma

Bütün NHL'ların yaklaşık % 4'ünü oluşturan küçük lenfositik lenfoma (SLL) foliküler bir yapısı olmayan tek düşük dereceli lenfomadır (59).

**Morfoloji:** Hücreler, koyu boyanan yuvarlak nükleusları, dar sitoplazmaları ve boyut farklılıkları olmaması ile küçük, uyarı almamış görünümlü hücrelerdir (Şekil 2.12). Mitoz ender olarak görülür ve çoğu vakada kemik iliği tutulumu vardır. Hastaların % 40'ında neoplastik hücreler kana yayılır ve kronik lenfositik lösemi benzeri bir tablonun ortaya çıkmasına neden olurlar. SLL, hem klinik hem de morfolojik olarak kronik lenfositik lösemi ile ve bazen de Waldenström Makroglobülinemisi ile örtüşen özelliklere sahiptir (59).



**Şekil 2.12.** Küçük lenfoblastik lenfoma. Tümör hücreleri matür, uyarı almamış lenfositlere benzeyen koyu boyanan yuvarlak nüveli, dar sitoplazmalı hücrelerdir. Bunlar çok az boyut farkı gösterirler (59).

**İmmünfenotip:** SLL'lerin yaklaşık % 90'ı yetişkin B hücrelerinden oluşan tümörlerdir. Bu nedenle, yüzeylerinde IgM (yüzey immünoglobülin D ile birlikte ya da onsuz) ve pan-B hücre antijeni CD19 içerirler. Ayrıca tüm T hücrelerinde bulunan ve normal B hücrelerinin nadiren içerdiği bir antijen olan CD eksprese ederler. SLL'li hastaların yaklaşık % 10'unda T hücreli tümör bulunmaktadır (59).

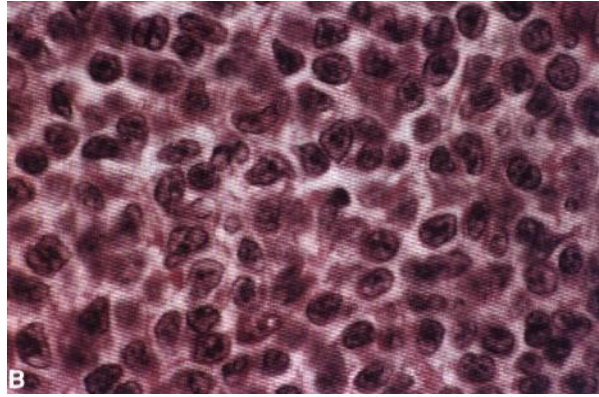
**Klinik Özellikler:** SLL (onunla ilişkili kronik lenfositik lösemi) primer olarak ileri yaş grubunda görülür. Hastalarda, jeneralize lenfadenopati, beraberinde hafif ya da orta dereceli karaciğer ve dalak büyümesi görülür. Eşlik eden semptomlar hafiftir ve genellikle uzun bir sağ kalım süresi vardır. Hastaların sık olarak hipogamaglobulinemisi olduğundan enfeksiyona eğilimlidirler. Bazı hastalarda ise otoimmün hemolitik anemi ya da trombositopeni izlenir (59).

#### 2.2.4.2. Foliküler Lenfoma

Foliküler lenfoma, Amerika ve Avrupa'da bütün NHL'ların % 35-40'ını erişkin B hücre lenfomalarının % 75-80'ini oluşturmaktadır (63).

**Morfoloji:** Foliküler lenfoma, bir folikül merkez hücrelerinden oluşur. Santrositler ve santroblastlardan oluşan lenfomaların % 90'ında en azından kısmen foliküler patern vardır (63).

Bunlar lenfoid foliküllerdeki normal antijen ile uyarılmış B hücrelerine benzer hücrelerden oluşan B hücreli tümörlerdir. Değişik oranlarda normal folikül merkezi hücreleri içerirler. Foliküler küçük çentikli lenfoma, foliküler NHL'ların en sık görülen tipidir. Bu tipte neoplastik B hücreleri normal lenfositlerden biraz daha büyük boyutlu içerdiği belirgin girintiler ve kıvrımlar nedeniyle köşeli “çentikli” görünümde bir nükleusa sahip hücrelerdir (Şekil 2.13). Nükleer kromatin kaba ve yoğunlaşmış yapıdadır ve nükleolus belirgin değildir. Mitoz seyrekdir. Küçük çentikli hücreler yaklaşık olarak eşit sayıdaki büyük hücrelerle karışık bulunurlarsa, bu tümörler foliküler mikst küçük çentikli ve büyük hücreli olarak adlandırılırlar. Büyük hücreler küçük lenfositlerin üç dört katı büyüklükte olup nükleol içeren veziküler nükleuslara sahiptirler. Nükleer membranda girintiler olabilir ya da olmayabilir (59).



**Şekil 2.13.** Foliküler küçük çentikli hücreli lenfoma. Neoplastik lenfositler normal lenfositlerden hafif büyüktür. Ancak nükleer kontür girintili çıkıntılıdır (59).

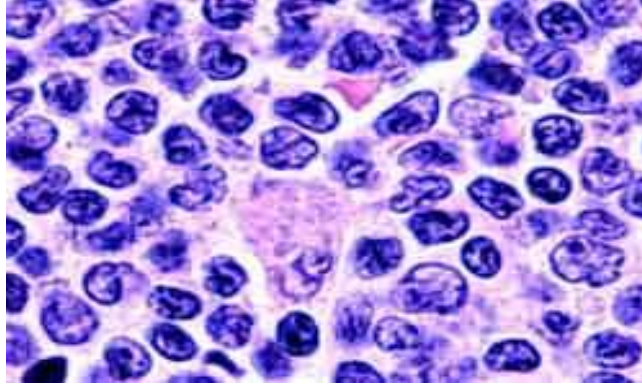
**İmmünofenotip:** Foliküler lenfomada neoplastik hücreler yüzey Ig ve tek hafif zincir pozitifdir. B hücre ilişkili antijenler (CD19, CD20, CD22, CD79a) ve BCL2, CD10, BCL6 pozitifdir. CD5 ve CD43 negatifdir, ancak diffüz alanlar içeren derece 3 olgular CD43 pozitif olabilirler (63).

**Klinik Özellikler:** Daha çok yaşlı kişilerde görülmektedir. Erkeklerde ve kadınlarda eşit olarak rastlanırlar (63). Hastalık sıklıkla genel olarak görülen ağrısız lenfadenopati ile kendini gösterir. Hastaların % 10'u B semptomları ile başvurur. Nodal bölgelerde

tutulum yaygındır. Bunun yanı sıra dalak ve kemik iliğinde de tutulum söz konusudur. Kemik iliği biyopsisi hasaların % 40'da pozitifdir (60). Hemen hemen bütün hastalarda, tümör hücrelerinde karakteristik translokasyon t(14:18) görülür. Kromozom 18'deki kırılma noktası anti-apoptoz geni olan *bcl-2*'nin haritalandığı 18q21'dedir. Bu translokasyon *bcl-2*'nin fazla ekspresyonuna neden olur (59,60,62).

### 2.2.4.3. Mantle Hücreli Lenfoma

Bu tümörler Working formulation tarafından tanımlanmışlardır. Mantle hücreli lenfomalar, lenfoid foliküllerin merkezinden değil mantle bölgesinden kaynaklanan B hücre tümörleridir (60).



**Şekil 2.14.** Mantle Hücreli Lenfoma. Tümör hücreleri normal lenfositlerden biraz daha büyük boyutlu, düzensiz çentikli ve yuvarlak nükleusa sahiptir (59).

**Morfoloji:** Mantle hücreli lenfomalar, lenf gangliyonunda difüz paternde bir tutulum sergilerler. Tümör hücreleri normal lenfositlerden biraz daha büyük boyutlu, düzensiz, çentikli ve yuvarlak nükleusa sahip hücrelerdir. Nükleoller belirgin değildir; bu nedenle, histolojik olarak küçük çentikli hücreli lenfomalara çok benzerler, nadir olarak foliküler lenfomalara benzerler (Şekil 2.14) (59,60).

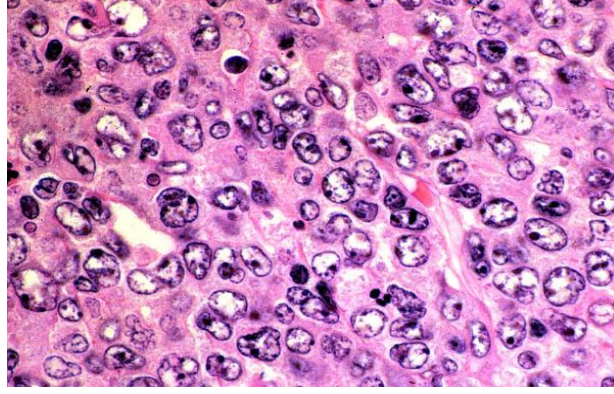
**İmmünfenotip:** Tümör hücreleri, yüzeylelerinde IgM ve IgD, CD19, CD20 ve CD22 gibi B hücre antijenlerini eksprese ederler (63). CD10 negatifliği ve CD5 pozitifliği ile folikül merkez hücrelerinden ayırt edilebilirler (59,60).

**Klinik Özellikler:** Mantle hücreli lenfoma tüm olguların % 5'ini oluşturur (64). Bu tümörler daha çok yaşlı erkeklerde görülürler. Lenf gangliyonlarına ek olarak dalak, Waldeyer halkası, kemik iliği, gastrointestinal yol gibi ektranodal bölgeler de tutulur. Agresif tümörler olup, tedavi mümkün değildir. Ortalama yaşam süresi 3-5 yıldır. Hücreler hücre siklusu düzenleyicisi olan siklin D<sub>1</sub>'i kodlayan genin aktive olmasına yol açan karakteristik t(11;14) translokasyonunu gösterirler (59).

#### **2.2.4.4. Diffüz Büyük Hücreli Lenfoma**

Bu klinikopatolojik grup, çeşitli klinik alt gruplara ayrılır. Diffüz mikst küçük ve büyük hücreli ve diffüz immünoblastik lenfomalar fenotipik ve histolojik olarak heterojen bir grup oluşturmalarına rağmen, bu tümörlerin çeşitli ortak klinik özellikleri ve agresif bir doğal gidişleri vardır. NHL'ların yaklaşık % 50'sini oluştururlar (59,60).

**Morfoloji:** Bu gruptaki iki tümör (difüz mikst ve difüz büyük hücreli) foliküler mikst ve foliküler büyük hücreli lenfomaların diffüz tipleri olarak kabul edilebilirler. Bu tümörler ya küçük çentikli ve büyük hücrelerin bir karışımından ya da baskın olarak büyük hücrelerden oluşurlar. Mikst tümörlerin küçük çentikli hücre komponenti foliküler küçük çentikli lenfomalarda tanımlanan hücrelere benzerlik göstermektedir. Büyük çentikli hücrelerin nükleusları düzensiz, girintili çıkıntılı ve normal histiyositlerin nükleuslarından daha büyüktürler. Nükleer kromatin dağınık olup, nükleolus belirgin değildir. Sitoplazma dar ve soluktur. Büyük çentiksiz hücreler, normal lenfositlerin 4 katı büyüklükte, yuvarlak oval nükleuslu ve bir ya da iki nükleolusa sahip hücrelerdir (Şekil 2.15) (59,62).



**Şekil 2.15.** Difüz büyük hücreli tip. Tümör hücrelerinin büyük nükleuslu, belirgin nükleollu ve daha büyük boyutlu olduğu izleniyor (59).

**İmmünofenotip:** Bu lenfomalar immünolojik olarak heterojendirler. Çoğu B hücre kökenlidir. Yaklaşık % 15’inde T hücre kaynaklı olduklarını gösteren T hücre yüzey belirleyicileri ve yeniden yapılanmış T hücre reseptör genleri mevcuttur. Nadir tümörlerde ise makrofaj belirleyicileri görülür (53). DLBL sıklıkla Ig ve CD45’in yanı sıra bir ya da daha fazla B hücre antijenlerini (CD19, CD20, CD22, CD79a) ekspres eder (58).

**Klinik Özellikler:** Çoğunlukla yaşlı insanlarda görülsede, foliküler lenfomalardan farklı olarak yaş çerçevesi daha geniştir ve difüz büyük hücreli NHL’lar çocukluk çağı lenfomaların yaklaşık % 20’sini oluştururlar (59,62).

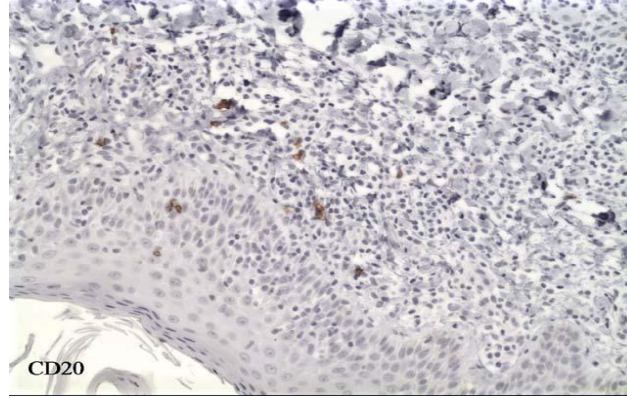
Foliküler lenfomalı hastalardan farklı olarak, bu tümörlere sahip hastalarda sıklıkla tek nodal ya da ektranodal bir bölgede hızlı büyüyen semptomatik bir kitle mevcuttur. Hastaların % 30’unda t(14;18) translokasyonu ve *bcl-2* geninin yeniden yapılanması mevcuttur (64).

#### **2.2.4.5. Lenfoblastik Lenfoma**

Bu yüksek dereceli tümör, yetişkin dönem NHL’larının % 4’ünü, çocukluk dönemi NHL’ların ise % 40’ını oluşturur. Bu tümör T hücreli akut lenfoblastik lenfoma (T-ALL) ile yakından ilişkilidir (59).



**Morfoloji:** Tümör hücreleri boyut bakımından hafif benzerlik gösterirler. Hücreler dar sitoplazmalara, küçük lenfositlerinkinden biraz daha büyük nükleuslara sahiptirler. Nükleer kromatin ince noktalanmalar gösterir ve nükleolus yoktur ya da belirgin değildir. Bazı vakalarda nükleer membran derin yarıklanmalar göstererek nükleuslarda parçalanmış (lobuler hale gelmiş) bir görünüme yol açar. Yüksek mitotik aktivite ve arada benign makrofajların neden olduğu “yıldızlı gökyüzü” manzarası tipik olarak görülür (Şekil 2.16) (59).



**Şekil 2.16.** Lenfoblastik tip. Hücreler dar sitoplazmalara, küçük lenfositlerden biraz daha büyük nükleuslara sahiptirler (59)

**İmmünofenotip:** Tümör hücreleri timüs içi T lenfositlerine benzerler. Çoğu vakada CD7 ve CD3 pozitifdir. Primitif lenfoid hücrelerin içerdiği bir enzim olan terminal deoksiniükleotidil transferaz tüm vakalarda pozitifdir (59).

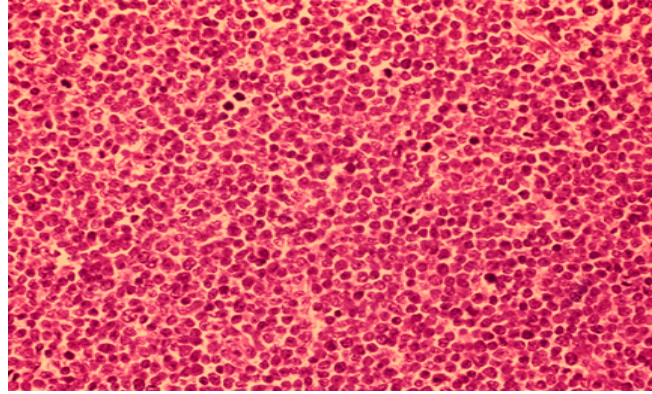
**Klinik özellikler:** Lenfoblastik lenfoma daha çok 20 yaş altındaki erkeklerde görülür. Hastaların % 50-70’inde görülen belirgin bir mediastinal kitle varlığı son derece karakteristiktir ve tümörün timus orjinli olduğunu işaret eder. Hastalık hızlı bir ilerleme gösterir; kemik iliğine buna bağlı olarak kana ve meninkslere erken yayılım T-ALL’ye benzer bir tablonun çıkmasına neden olur. Prognoz genellikle kötüdür. ALL’ye etkili olan protokoller ile agresif olarak yapılan tedavi çalışmalarında umut verici sonuçlar gözlenmiştir (59).



#### 2.2.4.6. Küçük Çentiksiz (Burkit) Lenfoma

Burkit lenfoma, NHL'ların en agresif tiplerinden biridir. Afrika'nın bazı bölgelerinde endemik, Amerika Birleşik Devletlerinin de dahil olduğu diğer bölgelerde sporadik olarak görülür. Afrika'da nonendemik olan tipler histolojik olarak birbirleriyle aynıdır; fakat arada klinik ve virolojik farklar mevcuttur (59,60).

**Morfoloji:** Tümör hücreleri, monoton, küçük lenfosit ile büyük çentikli hücrelerin boyutları arasında değişen orta boyutlarda, yuvarlak oval nükleuslu, ikiden beşe kadar değişen sayıda nükleole sahip hücrelerdir (Şekil 2.17). Nükleer boyut, tümör içerisindeki bening makrofajların ki kadardır. Ortalama miktarda, soluk bazofilik ya da amfofilik olan sitoplazmalar, yoğun olarak pironinofiliktir ve sıklıkla küçük, lipid dolu vakuelleri içerirler. Yüksek mitotik aktivite ve sık hücre ölümü bu tümörün karakteristik özellikleridir. Sık hücre ölümü nedeniyle nükleer debris içeren çok sayıda makrofaj mevcuttur. Bu bening makrofajlar genellikle berrak bir boşluk tarafından çevrelendiklerinden “yıldızlı gökyüzü” manzarasına neden olurlar (59).



**Şekil 2.17.** Burkit tipi. Tümör hücreleri ve nükleusları hafif uniform olduğundan tümöre monoton bir görünüm verirler. Yüksek mitotik aktivite ve belirgin nükleollere sahiptir. Arada soluk boyanan normal makrofajların neden olduğu “yıldızlı gökyüzü” yapısı mevcuttur (59).

**İmmünfenotip:** Bu tümörler yüzey IgM'leri ve CD19 gibi pan-B hücre belirleyicileri ve CD10 antijeni eksprese eden B hücre tümörleridir (60).

**Klinik özellikler:** Hem endemik, hem de Afrika dışı vakalar çocuklarda ve genç yetişkinlerde görülürler. Bunlar Amerika Birleşik Devletleri'nde çocukluk çağı NHL'lerinin yaklaşık % 30'unu oluştururlar. Hastalığın her iki formunda nadiren lenf gangliyonlarından kaynaklanır. Afrikalı hastalarda maksilla ve mandibula tutulumu gözlenmektedir. Bunun yanında abdominal tümörler (barsak, retroperiton, overler) ise Kuzey Amerika'da daha yaygındır. Lösemik transformasyon özellikle Afrika vakalarında nadirdir. Yüksek dereceli bir tümör olan Burkitt lenfoma insan neoplazmaları arasında en hızlı büyüyenidir (59).

## 2.2.5. Diğer NHL'lar

### 2.2.5.1. MALT Lenfoma

Bu tümör, ekstra nodal düşük dereceli B hücre tümörleri arasında farklı bir kategoride yer alır. En sık olarak tükrük bezi, ince ve kalın barsaklar, akciğerler gibi organlardaki mukoza ilişkili lenfoid dokudan (MALT) ve bazen de orbita ve meme gibi mukozal olmayan bölgelerden kaynaklanır. Sjögren Sendromu, Hashimoto tiroiti ya da midede *Helicobacter pylori* enfeksiyonu zemininde gelişen çoğu lenfoma bu kategoride yer alır (59).

### 2.2.5.2. Mikozis Fungoides ve Sezary Sendromu

Periferik CD4<sup>+</sup> T hücrelerinden kaynaklanan bu tümörler, deri tutulumu ile karakterizedir ve buna bağlı olarak T hücreli deri lenfomaları sınıfında yer alırlar (59).

Mikozis Fungoides (MF) CD4<sup>+</sup> yardımcı T-hücre (T-helper) fenotipinin hakim olduğu bir T-hücreli cilt lenfomasıdır. Cilt üzerinde kendini yama tarzında döküntüler, plaklar veya nodüler lezyonlar şeklinde gösterir. Uzun sağkalım süresi olan yavaş

seyirli bir hastalıktır. Uzun süre sadece cilde l kalize olarak kaldıktan sonra yıllar içinde sistemik/viseral tutulum gelişir (5).

Sezary sendromu hastalarda yaygın eritemli döküntü ve dolaşımda atipik çentikli “serebriform” lenfositlerin (Sezary hücreleri) varlığı ile karakterize MF benzeri bir hastalıktır. Sezary sendromunda yaşam beklentisi daha azdır, Hastalık MF’ye nazaran daha agresif bir seyir izler (5).

### **2.2.5.3.Yetişkin T hücreli Lösemi/Lenfoma**

Bu T hücreli neoplazm, bir retrovirüs olan T hücreli lösemi virüsü tip1’in (HTLV) neden olduğu bir enfeksiyon sonucu ortaya çıkar. Yetişkin T hücre lösemi/lenfoma deri lezyonları, jeneralize lenfodenopati, hepatosplenomegali, hiperkalsemi ve multilob CD4<sup>+</sup> lenfositlerin eşlik ettiği lökosit sayısındaki bir artış ile karakterizedir (5,59).

### **2.2.6. Epidemiyoloji**

NHL’lar Amerika’da kansere bağlı ölüm sebepleri arasında beşinci sırada yer almaktadır ve insidansı 1973’ten bu yana yaklaşık olarak iki katına çıkmıştır (61). NHL’lar HL’lara oranla daha yaygındır. Lenfomalı hastaların yaş ortalaması 42’dir. Geçen 15 yılda Amerika kanser topluluğu NHL’nın insidansında % 50 artış olduğunu bildirmiştir. Agresif ve yüksek agresif NHL’ya AIDS’in neden olduğu ileri sürülmüştür ve bu neoplazmlar çok hızlı bir şekilde artmıştır. Bununla birlikte Indolent (Erişkin) lenfoma insidansında da artma gözlenmiştir (5,62).

İngiltere de, NHL’ların insidansının yaşa bağlı olarak sabit bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca belli lenfoid neoplazmaları, spesifik yaş gruplarında daha olası bir şekilde meydana gelmiştir. Burkitt, lenfoblastik ve diffüz B-hücre lenfoma, çocukluk ağı lenfomalarında çok daha yaygın olarak görülmüştür. Indolent lenfomalar bu grupta nadir olarak görülür. Agresif lenfomalar, genç yetişkinlerde lenfoid neoplazmlardan daha yaygın olmasına rağmen ortalama yaşın 56 olduğu belirlenmiştir. İndolent ve

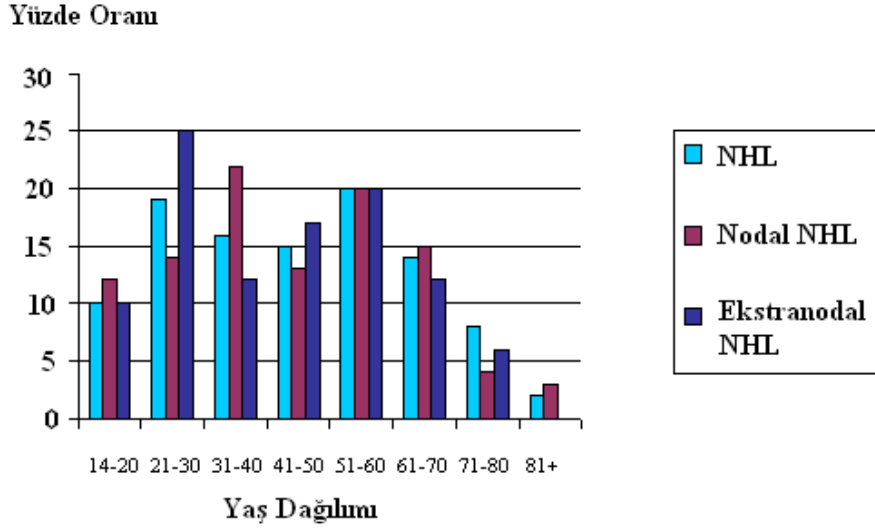
agresif lenfomanın insidansı yaş ile birlikte artmaktadır. 60 yaş civarı hastalarda ise lenfoid malignansilerin çok yaygın olduğu belirlenmiştir (62).

NHL, erkeklerde kadınlara oranla daha yaygındır ve bunların insidansının beyazlarda siyahlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (5).

NHL, dünyanın her yerinde görülmesine rağmen, spesifik lenfoid neoplazmlar belli coğrafik bölgelerde daha sık meydana gelmektedir. Örneğin foliküler lenfomalar Latin Amerika'da nadirdir. Bunun aksine, Burkitt lenfomaya tropikal Afrika'da daha sık rastlanır ve yetişkin T hücre lösemi/lenfoma Güneybatı Japonya'da daha yüksek oranda görülmektedir (62).

Türkiye'de NHL'lı hastalar malignant lenfomaların % 13'ünü oluşturmaktadır. Çalışılan olguların % 55'i nodal lenfoma, geri kalan % 46'sı ise ektranodal lenfomayı oluşturmaktadır (Şekil 2.18). Ektranodal lenfomanın % 66'sı gastrointestinal olgularında bulunmuştur. Başta mide (% 43) olmak üzere, barsak (% 30) ve karın bölgesinde (% 27) yaygın olarak gözlenmiştir. Türkiye'nin güney bölgesinde NHL oranının, Türkiye'nin genel ortalamasından daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Orta Doğu ülkelerinde ise ektranodal lenfomalar bütün lenfomaların % 40'ından daha fazla bir paya sahip olduğu belirlenmiştir (65).

NHL, batı ülkelerinde tüm malignansilerin % 3'ünü oluşturmasına karşın, Türkiye'de % 8, Orta Doğu ülkelerinde ise % 12 oranında bulunmuştur. Batı ülkelerinde nodal hastalık esas teşkil ederken, ektranodal hastalık bütün olguların yaklaşık % 10-24'ünü oluşturur. Gelişen ülkelerde ektranodal lenfoma, NHL olgularının % 40'ından daha fazlasını oluşturduğu bildirilmiştir (65).



Şekil 2.18. Non- Hodgkin Lenfomalı hastaların yaş dağılımı (Kaynak 65'den modifiye edilmiştir).

## 2.2.7. Etiyoloji

Kongenital ve kazanılmış immünyetmezlik durumları, otoimmün hastalıklar, enfeksiyöz ajanlar, fiziksel ve kimyasal ajanlar gelişen NHL'nin riskini arttırmaktadır (62).

### 2.2.7.1. İmmün Yetmezlikler

#### 2.2.7.1.1. Kongenital İmmün Yetmezlik Hastalığı

Kongenital immün yetmezlik hastalığı ataxia-telangiectasia, Wiscott-Aldridge sendromu, çeşitli kombine immün yetmezlik ve X'e bağlı lenfoproliferatif sendromu (XLP) NHL'nin insidansını arttırmaktadır. Ataxia-telangiectasia'lı hastalar da DNA'da tamir defektleri ve yanlış rekombinant durumlar gözlenir. Ataxia-telangiectasia'lı çocukların yaklaşık % 10'unda difüz büyük B hücre lenfoma gelişmektedir. Wiscott-Aldridge sendromlu çocukların % 50'sinde gelişen diffüz büyük B hücre lenfomaları santral sinir sistemi de dahil olmak üzere primer eksranodal bölgelerde gelişir. Wiscott-

Aldridge sendromu uniform bir şekilde EBV (Epstein-Barr virus) ile ilişkilidir. Erkek çocuklarının yaklaşık % 35'inde EBV'e bağlı olarak gelişen XLP'li agresif ve yüksek agresif B-hücre lenfomaları gözlenir (62).

#### **2.2.7.1.2. Kazanılmış İmmün Yetmezlik**

Solid organ transplantasyonunu izleyen, immünosupressif tedavi gören hastalarda ikinci bir lenfoid malignensi gelişme riski oldukça yüksektir. Örneğin, renal transplant hastaların % 2'si ve kardiyak transplant alıcılarının % 5'inde sırasıyla NHL gelişir (62).

#### **2.2.7.2 Otoimmün Hastalıklar**

Rheumatoid arthrit ve sistemik lupus erythematosus gibi otoimmün hastalıklar ve lenfoma arasında belli bir ilişki vardır. Kronik immünosupressif tedavi gören rheumatoid arthrit ve systemic lupus erythematosus hastalarında, lenfoid malignansilere eğilim artmaktadır (62).

#### **2.2.7.3. Kimyasal ve Fiziksel Ajanlar**

Bir çok değişik kimyasal ve fiziksel ajanlar, gelişen lenfomanın riskini arttırmaktadır. Anticonvulsat diphrnylhydantoin (dilantin) lenfoid hiperplazi ya da "psödolenfoma"yı indükleyebilir ve bu lenfomaları diğer lenfomalardan ayırmak çok zordur. Fenoksiherbisit ve organofosfat gibi diğer kimyasal ajanlarda lenfomanın gelişimini indüklemektedir. Benzen, stiren, 1-3 bütadien, trikloroetilen, perkloroetilen, arsenat, formaldehit, boya tinerleri, makine yağları gibi solventler ve kimyasallar NHL riskini arttırmaktadır. Bu solventlere maruz kalan hastalarda lenfoma gelişmekte ve kompleks kromozom anomalileri, immüoglobulinin ağır zincir gen lokusunda (14q32) sıklıkla translokasyonlar meydana gelmektedir (62).

Kullanılan sa boyaları da lenfoma riskini arttıran diğer etkenlerdir. Nükleer patlamalar ve reaktör kazaları lenfoma gelişimini indüklemektedir (62).

### **2.2.8. NHL’da Tanı ve Evreleme**

Kanserlerin bir çok formunda, evrelerin belirlenmesi, planlanan tedavide ve olası teğhislerin (prognoz) değerlendirilmesinde yardımcı olacaktır. Histopatolojik tanı; lenf nodu biyopsisi ile konur. Diğer bir çok kanserde olduğu gibi NHL, kanserin geniş alana yayılması ile kateregorize edilebilir.

#### **2.2.8.1. Ann Arbor Evrelemesi**

Evreleme; hem Hodgkin hem de Non-Hodgkin Lenfoma da Ann-Arbor Evreleme Metodu ile evrelendirilir. Her evre kendi içinde A (sistemik semptomların yokluğu) B (sistemik semptomların varlığı) olarak ikiye ayrılmıştır (izelge 2.3) (66).

**Çizelge 2.3.** Ann Arbor sınıflandırması (66).

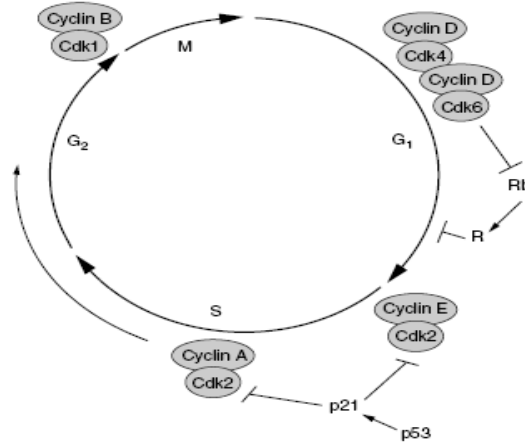
I	Tek bir lenf nodu bölgesi
IE	Tek bir ekstralenfatik organ
II	Diyafragmanın aynı tarafında iki ya da daha fazla lenf nodu bölgesi
IIE	Evre II'ye ek olarak diyafragmanın aynı tarafında ektranodal organda lokal tutulum
III	Diyafragmanın her iki yanında lenf nodu bölgelerinde tutulum
IIIE	Evre III'e ek olarak ve bir ekstralenfatik organda lokal tutulum
IIIS	Evre III'e ek olarak dalak tutulumu
IIISE	Evre III'e ek olarak dalak ve ekstralenfatik organda tutulum
IV	Bir ya da daha fazla ekstralenfatik organda lenf nodu tutulumu ile birlikte olan ve ya olmayan diffüz tutulum
Alt sınıflandırma	
A	Sistemik semptom yok
B	Ateş (38°C'nin üstünde, gece terlemesi, kilo kaybı (son 6 ayda vücut ağırlığının % 10'dan fazlası)



### 2.3. p15<sup>INK4B</sup> (MTS2) Geni

Proliferasyon, hücre bölünmesine yol açan multipl alt programların kompleks bir yoludur. Proliferasyonun merkezinde zamanlı bir şekilde tamamlanması gereken ve spesifik yol dizileri içeren hücre siklusu vardır. Bununla birlikte hücre siklus olaylarının regülasyonu multifaktöriyel bir olaydır ve beslenme durumunu, hücre boyutunu, gelişim faktörlerinin varlığını ya da yokluğunu ve genomun bütünlüğünü izleyen kontrol ve dengenin bir dizisini oluşturur. Bu hücre siklus regülasyon yolları, onkogen ve tümör supressör genler ile ilişkilidir (67).

Hücre bölünmesi G1, S, G2 ve M olmak üzere dört faza ayrılır. Tam olarak gelişim iki olay tarafından noktalanır. G0 fazında (istirahat fazı), hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanırlar. G1 fazında (ara faz, interfaz), spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenir. Geç G1 fazında bol miktarda RNA sentezlenir. Ayrıca, DNA sentezi için gereken bir çok enzim üretilir. S fazında (DNA sentezi fazı) hücre içindeki DNA'nın miktarı ikiye katlanır. G2 fazında DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder, mitotik "spindle"ların mikrotübüler prekürsörleri üretilir. M fazında (mitozis) protein ve RNA sentez hızı aniden yavaşlar, genetik materyal oluşan iki yeni hücreye dağılır. Mitozisi takiben oluşan yeni hücreler ya G0 ya da G1 fazına girerler (Şekil 2.19) (68).



**Şekil 2.19.** Hücre sikusu modeli ve her bir hücre sikusu fazında gerekli olan siklin/cdk kompleksleri (68).

Hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması (replikasyonu) dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazlardan geçer ve hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogenler ve hücre siklusuna özgü proteinler hücre siklusu boyunca senkronize bir şekilde aktive edilir ve ardından inaktifleştirilir. Hücre siklusu, siklinler ve siklin bağımlı kinazlar olarak sınıflandırılan iki protein tarafından kontrol edilir. Memeli hücrelerinde en az 8 siklin ve 12 siklin bağımlı kinaz (CDK) tanımlanmıştır. Bunlar hücre siklusunun çeşitli fazlarını aktive eden spesifik proteinlerdir. Bölünme yeteneğine sahip çoğu normal hücre büyüme faktörleri, bazı hormonlar ve hücre yüzey reseptörlerini etkileyen antijen-histokompatibilite kompleksleri gibi dış uyarılara karşı yanıt olarak bölünür. Bu hücre yüzey reseptörleri alınan sinyali iletir ve hücre bölünür. Tirozin kinazlar hücre dışı büyüme faktörlerinden nukleusa kadar olan bir kaskad (arka arkaya gelen bir dizi süreç) şeklinde ilerleyen proliferatif sinyal sürecinin çok önemli bir parçasıdır. Siklinler, kendilerine spesifik olan ve siklin-bağımlı kinazlar olarak adlandırılan tirozin kinazlarla kombine olurlar, onları aktive ederler ve etkilerini düzenlerler. Hücre siklusunda çeşitli fazlarda çeşitli siklinler sentezlenir ve düzeyleri senkronize bir şekilde siklusun çeşitli fazları boyunca azalır ya da artar (67,68).

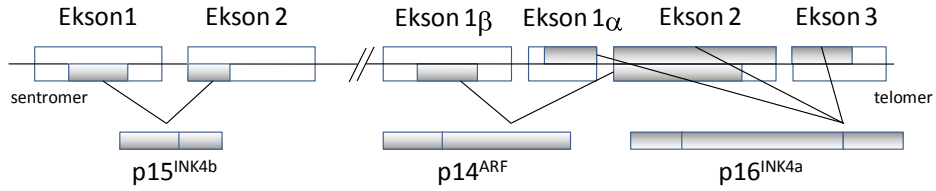
Siklinler, CDK'lara benzer fonksiyonlara sahiptirler. Bütün siklin tipleri protein niceliğinde salınım göstermemesine rağmen, hücre siklusu boyunca gelişiminde rol oynayan siklinler (siklin E, A, B) hücre siklusunun farklı fazlarında bulunmaktadır.

Siklin D1, restriksiyon noktasından önce G1 fazı esnasında sentezlenir ve R noktasının regülasyonunda önemli bir rol oynar. Siklin E, G1 fazının sonu ve S fazının başlangıcı esnasında bulunmaktadır ve G1 fazından çıkış için ve S fazı progresyonunda gereklidir. Bu G1 siklinlerin seviyesindeki artış kontrolsüz proliferasyonla sonuçlanır. Aslında Siklin D1 ve Silkin E bazı tümör tiplerinde fazla miktarlarda salınmaktadır. Spesifik siklin/cdk kompleksleri hücre siklusunun spesifik aşamalarında gerekmektedir. Siklin D1/CDK 4,6 kompleksinin esas substratı retinoblastoma tümör supressör proteindir. Rb, kinaz kompleksi tarafından fosforile edildiği zaman inaktive edilir. Siklin E/cdk2 kompleksi, S fazından G fazına geçişte proliferere hücreler için hücre siklusunda rol oynar. Siklin E, tümör hücrelerinin proliferatif kapasitesinin artmasıyla bazı göğüs kanserlerinde overekspresyona neden olur. Siklin A/CDK2, DNA replikasyonunu devam ettirir ve bu yüzden S fazı için gereklidir. Siklin B/CDC2, metafaz boyunca hücre mitozis evresine girdiğinde gerekmektedir. Metafaz sonunda siklin B seviyesinde düşüş olmaktadır ve CDK2 inaktive olur. Mitotik hücreler anafaza doğru ilerler ve mitozis tamamlanır. Siklin B/cdc2'nin devam eden aktivitesi metafazda durur (67,68).

Hücre siklus mekanizmasında görev alan bir diğer kompleks pozitif ve negatif regülatör yolaklarıdır. Önemli negatif regülatörler, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri ya da CKI (Siklin Kinaz İnhibitörleri)lardır. CKI'nın iki alt ünitesi bulunmaktadır: Cip/Kip ve INK ailesi. Cip/Kip ailesinin üç üyesi bulunmaktadır: p21/Cip1/waf1/Sdi1, p21/Kip1 ve p57/Kip2. Bu ailedeki proteinlerin tümü belli spesifitede ve siklin/cdk komplekslerini inaktive eden özelliktedir. Hücre siklusunu boyunca ilerleme için gereklidir. *p21<sup>waf1</sup>*, Cip/Kip ailesinin en iyi karakterize edilmiş ilk keşfedilen üyesidir. DNA hasarlarına cevapta ve DNA tamirini izleyen hücre siklus progresyonunu durduran *p53* tümör supressör proteini tarafından stimüle edilmektedir. CDK'nın INK4 ailesinin dört üye proteini *p16<sup>INK4A</sup>*, *p15<sup>INK4B</sup>*, *p18<sup>INK4C</sup>* ve *p19<sup>INK4D</sup>* dir. Cip/Kip ailesinden farklı olarak INK4 proteinleri özellikle cdk4/6 ile ilişkilidir. Sonuç olarak bunların esas fonksiyonu siklin D1/cdk4/6 aktivasyonunu regüle etmektir ve bu yüzden Rb tümör supressörün fosforilasyona neden olmaktadır (67).

Pozitif ve negatif regülatörler, hücre siklusunun normal fonksiyonuna katkıda bulunurlar (2). Ökaryotik hücrelerin hücre siklus gelişiminin regülasyonunu sağlayan CDK'nın aktivitesi, CDK'nın fosforilasyonu, CDK inhibitörleri siklinlerin ekspresyonlarını içeren kompleks mekanizmalar tarafından modüle edilmektedir (69).

Siklin Bağımlı Kinaz inhibitörleri hücre siklüsünün negatif regülatörleridir. Negatif regülatörler arasında  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$  gösterilmektedir. Bu genlerin dağılımı kontrolsüz hücre gelişimi ve hücre proliferasyonu ile sonuçlanır (2). Bu regülatörler 9p21 kromozomundaki komşu genlerdir.  $p15^{INK4B}$  geni,  $p16^{INK4A}$ 'ya sentromerik 25 kb'lık bölgesinde bulunmaktadır.  $p15^{INK4B}$  geni, iki ekzonun oluşumu 460 bp'lık kodlanan bölgeyi içerir ve ekzon iki yapısal olarak  $p16^{INK4A}$ 'ya homologtur (Şekil 2.20) (70,71).



Şekil 2.20. 9p21 bölgesi üzerindeki INK4 lokusu (72).

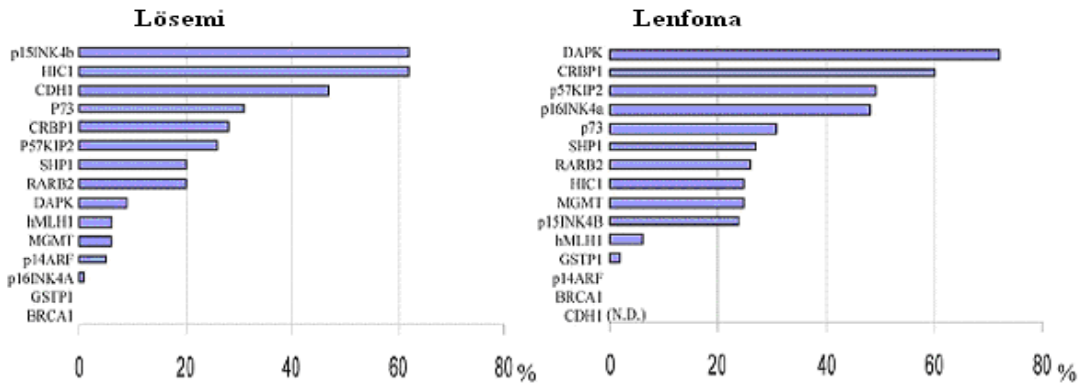
Bu genler, tek bir atasal genin duplikasyonundan meydana gelmişlerdir. Fare embriyolarında  $p15^{INK4B}$ 'in ekspresyonu  $p16^{INK4A}$ 'daki gibi düşüktür. Ancak bir ekspresyon paterni olan  $p16^{INK4A}$ 'ya karşın,  $p15^{INK4B}$  erişkin insan ve farelerin çeşitli organlarında saptanmıştır (böbrek, akciğer, testis gibi) (68).

İnsan kanserlerinde tümör-supressor genlerin CpG adacıklarında, lösemi ve lenfoma arasında kayda değer farklılıklar bulunmuştur. Hematolojik neoplazmların metilotipleri solid tümörlerden oldukça farklı olabilir (72). 9p21 bölgesindeki delesyonlar hem  $p16^{INK4A}$  hem de  $p15^{INK4A}$  genini etkilemektedir. Ancak  $p15^{INK4B}$  genini kodlayan dizilerdeki mutasyonlara rastlanmamıştır. Bu durum NHL kapsayan tümörlerin çoğunluğunda analiz edilmiştir.  $p15^{INK4B}$  promotör bölgesinin anormal metilasyonu, bu genin inaktivasyonunun alternatif bir mekanizması olarak tanımlanmıştır (73).  $p15^{INK4B}$ , CDK4'ün azalan Transforming growth factor-β (TGF-β) inhibitörüdür ve CDK4/CDK6 binding aracılığıyla G1 fazından S fazına geçişte inhibitör olarak görev yapmaktadır. TGF-β, hücre siklüsünün G1 fazını hücre

farklılaşmasının kontrolünü ve hücre apoptozunun indüklenmesiyle hücre proliferasyonunu inhibe eder ve hematopozisin çok güçlü negatif bir regülatörüdür (71,73).

Stone ve ark. hücre siklusu boyunca fosforillenmiş restinoblastoma (pRb) durumuna bakmaksızın, değişmeden kalan  $p15^{INK4B}$  mRNA seviyesinin T lenfositlerini stimule ettiğini bulmuşlardır.  $p15^{INK4B}$  geninin olgun T hücrelerinde hücre siklusunu regüle etmediğini öne sürmüşlerdir. Ericson ve ark.  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$  proteinlerinin primer T lenfositlerinde ekspresse edildiğini göstermişler ve RB1 geninin yanı sıra bu genlerin, T-hücre senesensi için önemli olduğunu öne sürmüşlerdir. Bunlar hücre senesensinin değişimi ile hücrelerin malignant transformasyonuna neden olurlar (2).

Kanserlerin çoğunda,  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$  sıklıkla homozigot delesyonlar ve ayrıca promotör hipermetilasyonlarla inaktive edilmektedir.  $p16^{INK4A}$  ve  $p15^{INK4B}$ 'nin hipermetilasyonu, sadece hematolojik malignansilerde gözlenir.  $p15^{INK4B}$  ekspresyonu transforming growth faktör  $\beta$ (TGF- $\beta$ ) tarafından aktive edildiği için başlıca hematopatik hücrelerde ekspresse edilir. Bu yüzden  $p15^{INK4B}$ 'nin epigenetik aktivasyonu bu hücrelere hayatta kalma avantajı sağlar. Hematolojik malignansilerde,  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$ 'daki delesyonlar ALL ve Non-Hodgkin Lenfomalı hastalarda gözlenmektedir. Genel olarak  $p15^{INK4B}$ 'de hipermetilasyon yaygın bir şekilde lösemide gözlenmektedir. Bunun aksine  $p16^{INK4A}$ 'nın promotör hipermetilasyonu lenfomalarda daha sık iken, lösemilerde nadir bir şekilde görülmektedir (Şekil 2.21) (2,72).



**Hematolojik Malignansilerde Tümör Spressor Genlerinin CpG Adacıklarındaki Hipermetilasyonun Yüzde Oranı**

Şekil 2.21. Lösemi ve lenfomada CpG adacıklarındaki hipermetilasyonun profili (72).

$p15^{INK4B}$ 'deki hipermetilasyon sıklıkla Akut lenfositik lösemi (ALL), akut myeloblastik lösemi (AML), myelodisplastik sendrom (MDS) ve akut promyelositik lösemi (APL)'de gözlenmektedir.  $p16^{INK4A}$ 'nın hipermetilasyonu NHL'da yaygındır ve bu tümör progresyonu ile ilişkilidir.  $p16^{INK4A}$ 'daki hipermetilasyon aynı zamanda Hodgkin Lenfomada da mevcuttur. Ancak aberrant  $p16^{INK4A}$  metilasyonu tümör oluşumunun erken aşamasında meydana gelebilir ve mycosis fungoidesin agresif olgularında görülebilir.  $p16^{INK4A}$ 'nın hipermetilasyonu multipl myeloma hastalarında da görülmüştür (72). Ne  $p15^{INK4B}$ 'te ne de  $p16^{INK4A}$ 'daki metilasyon kronik myelogenous lösemnin (CML) hiçbir aşamasında görülmemiştir.  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$ 'nın her ikisinde de gözlenen metilasyonun multipl myelomada daha sık olduğu belirlenmiştir.  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$ 'daki metilasyonun malign lenfomalardaki oranı % 64 olarak bulunmuştur. B hücre lenfomalarında % 32 ve T hücre lenfomalarında % 22-% 44 oranında bulunmuştur. Yüksek dereceli B hücre lenfomalarında metilasyon sıklığı  $p15^{INK4B}$ 'de %5,  $p16^{INK4A}$ 'da ise % 21'dir. Metilasyon tarafından genin fonksiyonunun durdurulması lenfomanın agresifliğinin azalması ile ilgili olduğu öne sürülmektedir (69).

## 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR) Tekniği

Karry B. Mullis tarafından 1985’de geliştirilmiş olan PCR, bir DNA dizisinin invitro koşullarda oluşturulan kimyasal reaksiyonlar ile istenilen miktarda çoğaltılmasıdır (74).

PCR, nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir test sistemidir. Hedef DNA/RNA’nın selektif olarak amplifikasyonuna imkan verir. İnvivo şartlarda bölünen bir hücrede DNA’nın replikasyonu çeşitli enzimler tarafından düzenlenen ve genomun kopyalanması ile sonuçlanan bir işlemdir. Bir test tüpü içerisinde gerçekleştirilen PCR’da in vivo çoğalma örnek olarak alınmıştır. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir (75).

Amplifikasyon bazlı teknikler; birinci reaksiyonda üretilen bütün nükleik asitlerin bir sonraki reaksiyon için kalıp görevi gördüğü, bir birini izleyen siklus serisi içinde tekrarlandıkları için ‘zincir reaksiyonu’ (chain reaction) olarak adlandırılmıştır (73). PCR dizisi bilinen iki bölge arasında uzanan DNA parçasını çoğaltmak için kullanılır. İki tane oligonükleotid, DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri sentetik tepkimenin primerleri olarak kullanılır. Bu oligonükleotidler farklı dizilere sahip olup, kalıp DNA’nın karşılıklı dizilerine bağlanırlar. Kalıp DNA ilk önce primerlerin varlığında denatüre edilir. Reaksiyon karışımı daha sonra, kalıp dizilere, primerlerin bağlanması için gereken sıcaklığa düşürülür. Bağlanmış olan primerler, uygun sıcaklığa çıkartılarak DNA polimeraz ile uzatılması sağlanır (76).

### 2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bileşenleri

Standart bir PCR reaksiyonu genellikle 50–100 µL’lik bir hacimde, 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µg/mL jelatin, 0,25 µM primer çifti, 200 µM dNTP (her biri dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1–2,5 U *Taq* polimeraz ve örnek DNA’nın varlığında gerçekleştirilir. Reaksiyon termal döngülerin programlandığı ve uygulandığı bir thermal cyler’da gerçekleştirilir. Genel olarak 94°C’de 20 sn’lik denatürasyon, 55°C’de 20 sn’lik bağlanma ve 72°C’de 30 sn’lik uzamadan oluşan 30

siklusluk bir döngü programı farklı uzunluklardaki birçok hedef dizilerin amplifikasyonu için kullanılabilir (77). PCR'ın gerçekleşebilmesi için ortamda;

- Kalıp DNA,
- Oligonükleotidler,
- Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dATP, dGTP, dCTP, dTTP),
- DNA-Polimeraz enzimi,
- PCR tampon içeriği gereklidir.

#### **2.4.1.1. Kalıp DNA**

PCR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA, araştırma laboratuvarları ve kliniklerden ya da ticari olarak elde edilebilirler (78).

#### **2.4.1.2. Primerler**

Oligonükleotid primerler, primer sentezi yapan laboratuvarlardan veya ticari firmalardan elde edilirler (78).

Oligonükleotidler genellikle 18–30 baz arasında sentezlenir ama daha az karmaşık olan DNA'ların (plazmidler veya daha önceden amplifiye edilen DNA'lar) amplifikasyonu için daha kısa primerler kullanılabilir (78,79).

Bir PCR'da başarılı bir amplifikasyon için önemli değişkenlerden biri olan primerlerin doğru tasarlanmasıdır. İyi tasarlanmış primerler arka plan ve özgül olmayan ürünlerin oluşmasını engellemeye yardımcı olur (76). Primer dizilerinin G+C içeriği, amplifiye edilecek bölgenin G+C içeriğine yakın olmalıdır. Özellikle 3' ucunda sekonder yapılar taşıyan dizilerden kaçınılmalıdır. Primerler birbirleriyle komplementer oluşturacak nitelikte olmamalıdır. 24–30 bazlık uzun primerler 60°C ve üzerindeki bağlanma sıcaklığında oldukça iyi çalışmaktadır (79).



Düşük konsantrasyonda primer kullanımı az miktarda reaksiyon ürünü elde edilmesine, yüksek konsantrasyonlarda kullanım ise düşük spesifikiteye neden olur ki bu durum jelde çok farklı ampliconların tespiti ile mümkündür. Ancak yüksek primer konsantrasyonları, primer-dimer artefaktlarının oluşmasına da neden olmaktadır. Primerlerin genellikle 0.1–0.5  $\mu\text{M}$  arasındaki derişimi en elverişli olanıdır (76). Sık aralıklarla tekrarlayan dondurup-çözdürme olmaksızın hazırlanan primerler  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de amonyumlu sıvılarda uygun bir şekilde saklanabilirler (79).

#### **2.4.1.3. Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dNTPs)**

Yeni DNA sentezi için dört deoksiribonükleotid fosfat; dATP, dCTP, dGTP, dTTP gereklidir. Stok dNTP çözeltileri pH 7.0'a nötralize edilmeli ve stoklar 10 mM'a sulandırılıp küçük porsiyonlar halinde  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmalıdır. Optimal dNTP konsantrasyonu;  $\text{MgCl}_2$  konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, primer konsantrasyonuna, çoğaltılmış ürünün boyuna ve PCR siklus sayısına bağlı olarak değişir. En uygun dNTP konsantrasyonu deney koşullarına göre belirlenmelidir. Taq DNA polimeraz enzimi düşük dNTP konsantrasyonlarında kalıba uygun bazları seçmede daha başarılıdır. Bu nedenle hedef dizi bileşimi ve uzunluğu için uygun en düşük dNTP konsantrasyonu seçilmelidir. Ayrıca 4 dNTP'nin eşit konsantrasyonlarda seçimi önemlidir (79,80).

#### **2.4.1.4. DNA-Polimeraz Enzimleri**

DNA polimeraz enzimleri kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA molekülü meydana getirmek üzere orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak 4 çeşit dNTP'den uzun polinükleotid zincirinin sentezini kataliz ederler (79). Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primer) ihtiyaç duyarlar. Sentezin yönü  $5' \rightarrow 3'$  ucuna doğru olup, primerin serbest  $3'$  hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır (80,81).

Thermostabil enzimlerden en yaygın olarak kullanılanı Taq DNA polimerazdır. Yüksek derecede saflaştırılmıştır ve nonspesifik endonükleaz ve ekzonükleaz aktivitelerinden arındırılmıştır. Taq DNA polimeraz, tek bir polipeptid zinciri içerir ve ağırlığı yaklaşık olarak 94 kD'dur. 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi olmayan enzim maksimum aktiviteyi pH 8.8 ve 68°C civarında göstermektedir. Taq DNA polimeraz, termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan izole edilmiş rekombinant bir enzimdir. Taq polimerazın düzeltme işlevi yoktur. Bu nedenle her PCR siklusunda  $2 \times 10^{-4}$  nükleotidte bir oranında yanlış nükleotid birleşme olasılığı vardır. Enzimin reaksiyondaki konsantrasyonu da önemlidir. 100 µL'lik bir reaksiyonda enzim konsantrasyonu 1-5 U arasında olmalıdır (76, 80).

#### **2.4.1.5. Tamponlar ve MgCl<sub>2</sub> Karışımı**

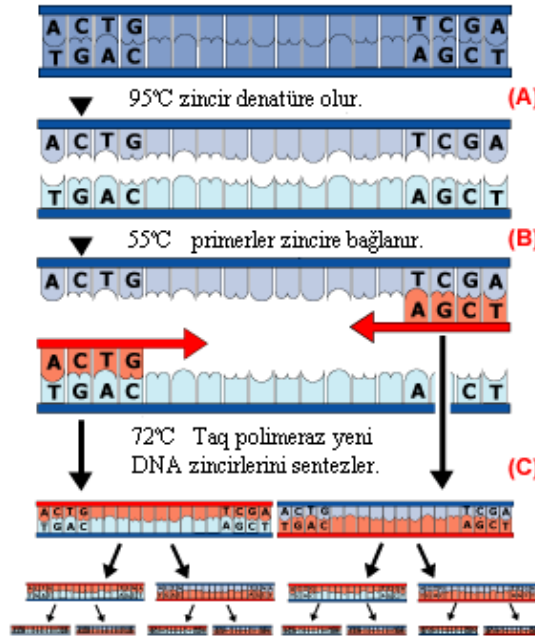
Çeşitli reaksiyon tamponu formülasyonları bildirilmiştir fakat 1988'de Saiki ve ark.'nın tanımladığına benzer bir görüş birliği ortaya çıkmaya başlamıştır. Buna göre bir PCR tamponu; final konsantrasyonunda, 10 mM Tris (pH 8,4) , 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, % 0.01 jelatin, % 0.01 NP<sub>40</sub> ve %0.01 Tween 20 içerir. Non-iyonik deterjanlar yerine %0.1'lik Triton X-100 kullanılabilir. Tuz konsantrasyonu değiştirilebilir (KCl'ü azaltmak veya ortadan kaldırmak için) ve yükseltilmiş magnezyum konsantrasyonu ile primerlerin daha iyi çalıştığı gözlenir. Ayrıca dNTP'ler ile magnezyum arasında dayanıklı etkileşimler de gözlenir. Bunun sonucunda dNTP'lerin yüksek konsantrasyonu magnezyuma bağlanır ve mevcut magnezyum konsantrasyonunu azaltır. Bu yüzden eğer dNTP'ler yüksek konsantrasyonda kullanılıyorsa, magnezyum konsantrasyonunu arttırmak gerekebilir (79).

MgCl<sub>2</sub>, primer bağlanmasını, PCR ürünü ve kalıp zincir ayrışma ısılarını, ürün özgüllüğünü, primer-dimer kalıntılarının oluşumunu, enzim etkinliğini etkilemektedir. Ayrıca MgCl<sub>2</sub> dNTP'lerle çözünebilir kompleksler oluşturarak polimeraz enziminin aktivitesini artırır. Primer stoklarında ve kalıp DNA'larda EDTA'nın varlığı uygun MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunu değiştirir. İdeal olarak genelde 1-1,5 mM konsantrasyonda kullanılır. Düşük MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarının ürün oluşumunda azalmaya, yüksek

MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarının ise non-spesifik ürünlerin birikimine neden olacağı unutulmamalıdır (81).

#### 2.4.2. PCR Evreleri

PCR reaksiyonunda 3 temel basamak vardır ve çoğaltılmış ürün miktarı, teorik olarak bu üç adımın tekrarlanma sayısına bağlıdır (Şekil 2.22) (78,81-83).



**Şekil 2.22.** PCR aşamaları. (A) Çift iplikli hedef DNA'nın ısı ile (95°C) tek iplikli DNA'ya denatürasyonu (B) Ortamın 55°C'ye soğutulması ile primerlerin DNA'ya bağlanması (C) Sıcaklığın 75°C'ye yükseltilmesi ile yeni DNA zincirlerinin sentezi (83).

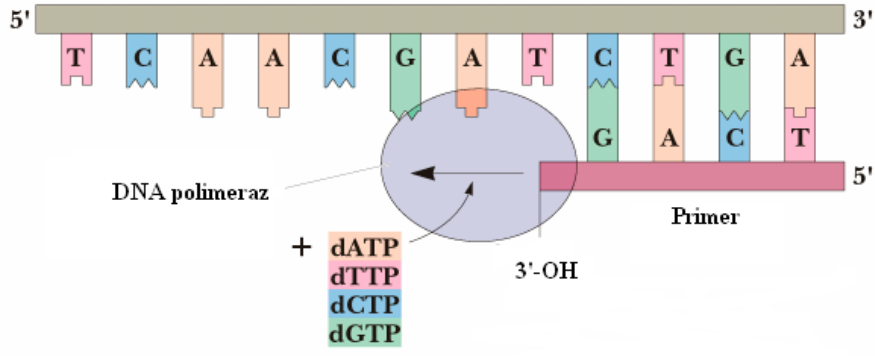
**1. Denatürasyon:** Genomik DNA gibi kompleks yapıların tam olarak denatürasyonunu sağlamak amacıyla yüksek sıcaklıklar kullanılır. DNA molekülünün her iki iplikçığı birbirine hidrojen bağları ile tutulmuşlardır. G+C' den zengin hedefler için daha yüksek ısılar gereklidir (G-C arasında üç; A-T arasında iki bağ). Isının yükseltilmesiyle (92-94°C) bu bağlar kopar ve iki iplikçik birbirlerinden ayrılırlar. Denatürasyonun tam

olarak gerçekleşmesi önemlidir. Tamamlanmamış denatürasyon DNA zincirlerinde kopmalara neden olarak ürün verimini azaltır. Ayrıca Taq DNA polimerazın yarı ömrü de dikkate alınmalıdır. Taq DNA polimeraz enzimi 92,5°C’de 2 saatten fazla, 95°C’de 40 dakika ve 97°C’de ise 5 dakika yarı ömüre sahiptir. Çok yüksek ısı ve uzun süreli denatürasyon gereksiz enzim kaybına neden olur (80).

**2. Primerin Bağlanması (annealing):** Isının aniden düşürülmesi (37-65°C arasında; 55°C ideal) ile ortama ilave edilmiş olan primerler, ayrılmış nükleik asit zincirlerinin, komplementer bölgelerine bağlanırlar (primerler 15-30 bazdan oluşan oligonükleoidler olup, etkene özgül olarak önceden sentezlenmişlerdir). Primer yapışması için gerekli zamanın uzunluğu ve ısı primerlerin uzunluğuna, baz içeriğine ve konsantrasyonuna bağlıdır. Uygun olan annealing derecesi primerlerin Tm’inin 5°C altındadır. Annealing derecesinin artması yanlış yapışmış primerlerin ayırt edilmesini sağlar ve primerlerin 3’ ucundaki yanlış birleşmiş nükleotidlerin uzamasını engeller. Bu nedenle ilk bir kaç siklus sırasındaki yüksek annealing derecesi uygulanması PCR özgülüğünü artırır (80,81).

**3. Primerlerin Uzaması (extension) ve Amplifikasyonu:** Isının 72°C’ye yükseltilmesi ile ortamdaki Taq polimeraz enzimi, uygun bölgelere bağlı primerlerden hareketle ve yine ortama ilave edilmiş nükleotidleri kullanarak, yeni ve komplementer zincir sentezini gerçekleştirir. Bu sentez 5’ ucundan 3’ ucuna doğru ve kalıp görevi yapan ana zincirin her bir bazının karşısına, komplementeri olan baz yerleşerek ilerler. Uzama zamanı hedef dizinin konsantrasyonuna, uzunluğuna ve ısıya bağlıdır. Primer uzaması aşamasında genellikle Taq/Amplitaq DNA polimerazların aktivitesi için en uygun sıcaklık 72°C’dir. 2 kilobaza kadar olan ürünler için bir dakika uzama süresi yeterlidir. Daha uzun ürünlerde iki dakika veya daha fazla süre uygulanabilir (80,81).

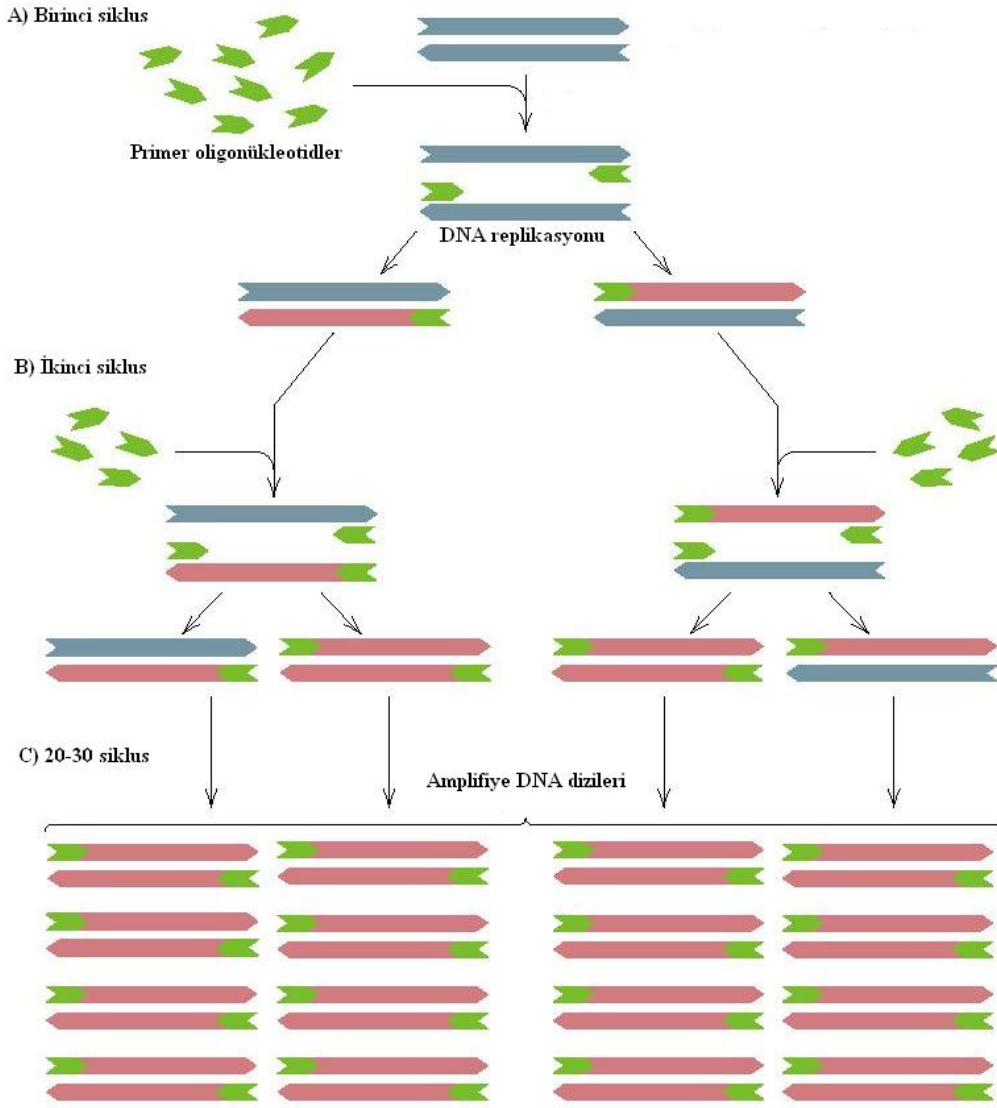
Zincir uzaması aşamasında kalıp DNA’ya bağlanmış primerlerin 3’-OH gruplarına kalıp DNA’daki bazlara uygun olarak deoksiribonükleotidtrifosfatlar (dNTP) bağlanarak zincirin uzaması sağlanır. Bu işlem ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi olan *Taq* polimeraz ile katalize edilir (Şekil 2.23) (77).



Şekil 2.23. Zincir uzaması (77).

Uzamayı takiben orijinal DNA segmenti; yeni cDNA'lar ve bunu takiben yeni kalıp DNA'lar oluşturur. Böylece her PCR siklusunda mevcut spesifik DNA miktarı iki katına çıkmaktadır (77).

PCR uygulamalarında üç evre bir döngü olarak kabul edilir, bir döngü 3-5 dakika sürer. Bir döngü sonunda sentezlenen ürün, öncekinin iki katı kadardır. Döngü sayısı "n" olarak kabul edilirse "2n", çoğaltılmış DNA materyali miktarını verir. En uygun siklus sayısı hedef DNA'nın başlangıç konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. Siklus sayısının gerekenden fazla olması istenmeyen ürünlerin sentezinin artmasına neden olur. Yaklaşık 2-3 saat süren 20 döngülük bir reaksiyon sonunda 1 048 576, 30 siklus sonunda ise 270 000 000 amplifikasyon ürünü elde edilir. İdeal siklus sayısı 25-35 arasındadır. (Şekil 2.24) (80).



Şekil 2.24. PCR döngüleri (84).

Reaksiyon ortamındaki tüm bileşenlerin (tampon, nükleotidler, primerler, DNA ve enzim) termostabil olmaları nedeniyle, her siklus için sadece belirtilen sıcaklık değişikliklerinin yapılması yeterlidir. Bu işlem programlanabilir bir cihaz (thermal cycler, ısı döngü cihazı) ile otomatik olarak yapılmaktadır.

### 2.4.3. “Hot Start” (Sıcak Başlangıç) PCR Tekniği

Bir PCR uygulaması sırasında yapılan temel işlem, reaksiyon bileşenlerinin (enzim, MgCl<sub>2</sub>, dNTP’ler, primerler, tampon) bir tüp içinde karıştırıldıktan sonra (mastermix) hedef DNA’nın ortama konularak, thermal cycler’da PCR protokolünün tamamlanması beklenir. Tüm bu işlemler sırasında reaksiyon ortamının maruz kaldığı sıcaklık 4–25°C arasında değişir. Hedef DNA eklenip sistem termal cycler’a yerleştirilene kadar olan zaman dilimi içinde, hedef DNA ile primer arasında düşük eşleşme oranlı bir hibridizasyon meydana gelebilir. Bundan sonraki sıcaklık dereceleri 55–60°C’nin altına düşmese bile, spesifik olmayan ürünler sentezlenebilir ve bunlar reaksiyon spesifitesini önemli derecede düşürürler (85). Bu nedenle normal PCR protokolünde amplifikasyon karışımı hazırlanırken hedef DNA ve primerler arasında özgül olmayan bağlanmalar olabilmekte ve bu bağlanmaların polimeraz enzimi ile uzatılması sonucunda çok sayıda istenmeyen bant ortaya çıkabilmektedir. Bu istenmeyen reaksiyonları önlemek için geliştirilmiş olan “hot start” PCR tekniğinde, temel maddelerden (polimeraz, nükleotidler, Mg<sup>+2</sup> veya primerler) biri başlangıçta amplifikasyon tüpüne konulmamaktadır. Bu karışıma ilk denatürasyon işlemi uygulandıktan sonra eksik olan madde eklenir ve sıcaklık normal bağlanma derecesine soğutulur. Böylece özgül primer bağlanması gerçekleşir. Bu aşamadan sonra uygulanan amplifikasyon sonucunda daha net DNA bantı elde edilmiş olur (75).

## 2.5. Amplifikasyon Ürünlerinin Analizi

### 2.5.1. Agaroz jel elektroforezi

Hedef bölgenin amplifikasyonundan sonra, elde edilen ürünlerin bir şekilde belirlenmesi ve analizlerinin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla uygulanan en basit konvansiyonel yöntem agaroz jel elektroforezidir (77). Agaroz, deniz yosunlarından elde edilmiş lineer bir polimerdir. Ticari olarak elde edilen agaroz tamamen saf değildir. Polisakkarit, tuz ve proteinler ile kontamine haldedir. Bu kontaminasyonun miktarı DNA’nın jelde göçünü etkileyebilmektedir. Bu yüzden firmalar agarozun kimyasal olarak formüle edilmiş formunu satmaktadırlar (86).

Elde edilen PCR ürünlerinin fragment büyüklükleri, çalışmanın en başında bellidir. Seçilen veya dizayn edilen primerlerin hedefledikleri bölge ya literatür bilgileri ile bilinir veya ilgili mikroorganizmanın gen haritasına bakılarak bu büyüklük hesaplanır. PCR’da elde edilecek olan fragment büyüklüklerinde aynı olması gerekir. Bunun tespiti, elektriksel bir ortamda molekül ağırlığına göre ayırımının sağlandığı elektroforez metodlarıyla gerçekleştirilir. DNA negatif elektrik ile yüklü olduğundan dolayı pozitif kutba doğru göç eder. Agaroz jeli, porlu bir yapıya sahip olduğundan, elektriksel ortamda göç eden DNA fragmentlerini büyüklüklerine göre birbirinden ayırır. Jel ya elektroforezden önce veya elektroforezden sonra Etidyum Bromid (Et-Br) gibi bir DNA boyası ile boyanır. Bu boya 312 nm dalga boyundaki UV (Ultraviole, mor ötesi) ışığı ile floresan vermektedir (77).

Bu sebeple, Et-Br ile boyanmış jel UV transilüminatöründe görüntülenir ve fotoğrafı çekilerek incelenir. İstenen büyüklükteki DNA fragmentlerinin tespit edildiği örnekler “pozitif” kabul edilir. Fragment büyüklüğü hesaplamalarında, ticari olarak temin edilebilen standard DNA molekül ağırlığı kullanılmaktadır (77).



## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Hasta Grubu Kan Örneklerinin Toplanması

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği'ne ve Adana Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Onkoloji Kliniği'ne başvuran ve histopatolojik olarak Non-Hodgkin Lenfoma tanısı alan ve takip edilmekte olan ortalama yaş grubu 45 olan, 40 erkek ve 22 bayan olmak üzere 62 hasta ve kontrol grubu olarak 40 sağlıklı birey çalışmaya dahil edildi. NHL tanısında Real sınıflandırması kullanıldı.

### 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

#### 3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- Thermal Cyclers (Techne, Cambridge, UK)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Wealtec, ELITE 300)
- Elektroforez Tankı (Biolab, Mazfill, HU13)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Bio-Imaging Systems.)
- Soğutmalı Mikrosantrifuj (Sigma, 2-16K)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik)
- Derin Dondurucu (REGAL, RDD 1145)
- Etüv (Binder)
- Hassas Teraziler (Mettler Toledo)
- Buzdolabı (Regal, RBD 4602 NCF)
- Vorteks (Reax)
- Su Banyosu (GFL-Wasserbad Water Bath)
- Mikropipet Seti (Gilson- Pipetman- P 10, P100, P1000)

### 3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Tris-Hidroklorid (Amresco-0234)
- Sodyum Klorür (Merck-1.06404)
- Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (Merck-1.08421)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Laurly Sulfate)(Sigma-5750)
- Sodyum Bisülfid (MP Biomedicals Inc.-152573)
- Hidrokinon (Merck-8.22333)
- Amonyum Asetat (BIO BASIC INC.-CAS [631-61-8])
- Ethidium Bromid (Amresco-X 328)
- Orange G (Sigma O-3756)
- Etanol (Merck 1.00986)
- İzopropanol (2-propanol)(Sigma-I9516)
- Sükröz (Merck-1.07651)
- Agaroz (Sigma-A-5093)
- Taq DNA polimeraz (Fermentas-EP0402)
- 10XPCR Buffer (NH<sub>4</sub>) (Fermentas-EP0402)
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck-1.05833)
- 10mM dNTP Mix (Fermentas-R0192)
- Proteinaz K (Sigma- P 2308)
- 100 bp marker (100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas Vilnius, Lithuania)
- Distile su
- Primerler

p15 Sense Primer Dizisi

**P15 W-5'-CGCACCTGCGGCCAGA-3'**

**P15 M-5'-GCGTTCGTATTTTGC GGTT-3'**

**P15 U-5'-TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT-3'**

P15 Antisense Primer Dizisi

**P15 W-5'-AGTGGCCGAGCGGCCGG-3'**

**P15 M-5'-CGTACAATAACCGAACGACCGA-3'**

**P15 U-5'-CCATACAATAACCAAACAACCAA-3'**

### 3.2.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

#### 3.2.3.1 DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar

##### **Lysis Buffer**

(0.32 M Sukroz, 10mM Tris/HCl pH 7.5; 5mM MgCl<sub>2</sub>, % 1 Triton X100)

- Sukroz.....10,9 g
- Tris-HCl.....0,157 g
- MgCl<sub>2</sub>.....0,1 g
- Triton X100.....1 ml
  
- Kimyasal maddeler 50 ml distile suda çözüldü.
- pH'sı 7,5'e ayarlandı.
- Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- Oda ısısında muhafaza edildi.

### **Fizyolojik Tampon**

(0.075M NaCl, 0.025M EDTA)

- NaCl.....0,438 g
- EDTA..... 0,93 g
  
- Tartılan kimyasallar 50 ml distile su içerisinde çözüldü.
- Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- +4°C'de muhafaza edildi.

### **Tampon A**

(10mM Tris/HCl pH 8, 2mM EDTA)

- Tris-HCl.....0,157 g
- EDTA.....0,074 g
  
- Tartılan kimyasallar 50 ml distile su içerisinde çözüldü.
- Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

### **% 10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)**

- SDS.....1 g
  
- Tartılan kimyasal distile su ile 10 ml'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

### **Proteinaz-K (100 mg/ml)**

- Liyofilize 100 mg Proteinaz-K (Sigma)
- 1 ml steril distile su ile çözülerek 100 mg/ml'lik konsantrasyona getirildi.
- 50µl'lik porsiyonlara ayrıldı ve -20°C'de saklandı.

### **Doymuş Sodyum Klorür**

NaCl.....3,5 g

- Tartılan NaCl distile su ile 10 ml’de çözüldü.
- Oda ısısında muhafaza edildi.

### **İzopropanol**

- Mevcut stok izopropanoldan 50 ml alındı.
- -20°C’de muhafaza edildi

### **Etil Alkol (100 ml için)**

(% 70’lik etil alkol)

- Etil alkol.....70 ml
- Mevcut stok etil alkolden (% 96’lık) 70 ml alındı ve üzerine 24 ml distile su eklendi.

### **3.2.3.2. Bisülfıt Modifikasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar**

(1 mol/l NaOH, 10mM Hidrokinon, 1.5 M Sodyum Bisülfıt pH 5)

### **Sodyum Hidroksit**

- NaOH.....4 g
- Tartılan kimyasal 50 ml distile suda çözüldü.
- Distile su ile 100 ml’ye tamamlandı.
- Oda ısısında muhafaza edildi.

### **Hidrokinon**

- Hidrokinon.....0,01 g
- Tartılan kimyasal 5 ml distile suda çözüldü.
- Distile su ile 10 ml'ye tamamlandı.
- Oda ısısında muhafaza edildi.

### **Sodyum Bisülfid**

- Sodyum Bisülfid.....1,57 g
- Tartılan kimyasal 5 ml distile suda çözüldü.
- pH'sı 5'e ayarlandı.
- Distile su ile 10 ml'ye tamamlandı.
- Oda ısısında muhafaza edildi.

### **3.2.3.3 DNA Metilasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar**

#### **Amonyum Asetat**

- Amonyum asetat .....15,416 g
- 50 ml distile su içersinde çözüldü
- Otoklavda steril edildi.
- Oda ısısında muhafaza edildi.

#### **İzopropanol**

- Mevcut stok izopropanoldan 50 ml alındı.
- -20°C'de muhafaza edilidi.

### 3.2.3.4. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar

#### **10X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) Stok Solüsyonu pH 8.8**

- Tris Baz.....108 g
- Borik Asit.....55 g
- EDTA.....8,3 g
  
- Tartılan kimyasal maddeler distile suda çözüldü ve pH'sı 8,8 'e ayarlandı.
- Distile su ile 1 litre'ye tamamlandı
- Oda ısısında muhafaza edildi.

#### **Elektroforez Yürütme Tamponu (1XTBE)**

- 10X TBE Buffer stok solüsyonu distile suyla seyreltilerek 1XTBE tamponu hazırlandı. Hazırlanan 1XTBE tamponu elektroforez yürütme tamponu olarak elektroforez tankına konuldu.

#### **% 2 Agaroz Jel Solüsyonu**

- 1XTBE Buffer.....120 ml
- Agarose Basica LE Prona .....2,4 g
- Ethidium Bromide.....0,5 µg/ml

#### **Orange G Solüsyonu**

- 1mM Na<sub>2</sub>EDTA .....2,232 g
- Orange G .....200 mg
- Gliserol.....60 ml
- Distile Su .....40 ml

### 3.3. Kullanılan Yöntemler

#### 3.3.1. DNA İzolasyonu

Tam kan örneklerinden DNA izolasyonu Poncz yöntemine göre yapıldı (87).

#### DNA İzolasyonunun Yapılışı

- İçerisinde EDTA bulunan tüpe alınan kandan 500 µl alınarak 1,5 µl'lik steril eppendorf tüpüne kondu.
- Üzerine 1 ml lysis buffer (0,32 M Sukroz, 10mM Tris/HCl pH 7,5; 5mM MgCl<sub>2</sub>, % 1 Triton X100) eklendi ve karıştırıldı.
- Tüpler 5 dakika bekletildi ve 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süre sonunda süpernatant döküldü ve aynı adım bir kez daha tekrarlandı.
- Tüplere 1 ml fizyolojik tampon (0,075M NaCl, 0,025M EDTA) eklendi ve karıştırıldı.
- Bu karışım 13.000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı atıldı ve dipteki pellet üzerine 300 µl Tampon A (10mM Tris/HCl pH 8; 2mM EDTA) eklenip karıştırıldı.
- Bu karışım üzerine 10 µl SDS ve 25µl Proteinaz-K (100 mg/ml) konulup karıştırıldı.
- Tüpler 65°C'de 45 dakika bekletildi.
- Süre sonunda tüpler oda ısısına getirildi.
- Tüplere 50 µl doymuş sodyum klorür eklendikten sonra 15-20 saniye vortekslendi.
- Tüpler 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant steril yeni bir tüpe alındı.
- Süpernatant üzerine eşit hacimde izopropil alkol eklendi.
- Tüpler yavaşça alt üst edilerek DNA'nın ipliksi bir görünüm alışı izlendi.
- 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.



- Süpernetant kısım atılıp pellet halindeki DNA üzerine 1 ml % 70'lik soğuk etil alkol eklenip karıştırıldı.
- Tüpler 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı ve tüpler kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek alkol kurutuldu.
- Her tüpe 50 µl distile su eklenerek DNA 37 °C'de çözülmeye bırakıldı (bir gece).
- Elde edilen DNA molekülünün miktarı aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$\text{DNA derişimi } (\mu\text{l/ml}) = \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 50^*$$

\*1 cm ışık yollu küvette 1 OD'ye karşılık gelen µg/ml biriminden DNA miktarı.

Hazırlanan ekstrakt çalışılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

### 3.3.2. Bisülfıt Modifikasyonu

- İzole edilen DNA'dan 40µl alınıp steril bir eppendorf içeresine konuldu.
- Bunun üzerine 10 µl sodyum hidroksit eklendi.
- Daha sonra 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Süre sonunda tüplerin üzerine 30 µl hidrokinon ve 520 µl sodyum bisülfıt ilave edilip karıştırıldı.
- Örnekler 50°C'de 16 saat inkübe edildi.
- İnkübasyonun sonunda örnekler oda ısısına getirilerek saflaştırma işlemi uygulandı.

### 3.3.3. Modifiye DNA Örneklerinin Saflaştırılması

- DNA örneklerinin saflaştırılmasında iki ayrı yöntem kullanıldı.

### 3.3.3.1. "Wizard SV Gel" ve "PCR Clean-Up" Sistemi

- Bisülfid ile modifiye edilmiş örneklerin ayrı bir eppendorf tüpüne alındı.
- Üzerine eşit miktarda (550µL) binding solüsyonundan eklendi ve karıştırıldı.
- Kitin içinde bulunan minikolon tüple birleştirildi ve örnekler tüpün içine eklendi.
- Oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi. Tüpler 16.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Tüpte biriken süzöntü döküldü ve minikolon tekrar tüpe yerleştirildi.
- Üzerine 700 µl membran yıkama solüsyonu eklendi.
- 1 dakika 16.000xg'de santrifüj edildi.
- Süpernatant dökülüp, filtre ile mini kolon birleştirildi.
- Daha sonra üzerine 500 µl membran yıkama solüsyonu ilave edildi.
- 5 dakika 16.000xg'de santrifüj edildi.
- Süpernatant döküldü ve tüpler santrifüjün üst kapağı kapatılmadan 1 dakika santrifüj edildi.
- 1,5 ml'lik steril eppendorf tüpüne mini kolon dikkatlice yerleştirildi ve üzerine 50 µl nükleaz-free su ilave edildi.
- Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda tüpler 16.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Minikolon atıldı ve dipteki pellet 60 µl suda süspanse edildi.
- Üzerine son konsantrasyon 0,3 M olacak şekilde sodyum hidroksit eklendi.
- 5 dakika oda ısısında bekletildi.
- Daha sonra üzerine 1ml % 70'lik etil alkol ilave edildi.
- 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Alkol döküldü ve etüvde tüpler ters çevrilerek 10 dakika kurutuldu.
- Pellet, 15 µl distile suda süspanse edildi.

### 3.3.3.2. Amonyum Asetat ile Saflaştırma Yöntemi

- İçinde 100 µl PCR ürünü bulunan eppendorf tüpüne, eşit hacimde (100 µl) 4 M amonyum asetat eklendi.
- Daha sonra bu karışımın üzerine eşit miktarda (200µl) 2-propanol (izopropil alkol) ilave edildi.
- Tüpler karıştırılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi.
- Süre sonunda tüpler 12.000xg'de 15 dakikada santrifuj edildi.
- Süpernantant kısmı döküldü ve pellet üzerine 500µl % 70'lik etil alkol ilave edildi.
- Tüpler 12.000xg'de 15 dakika santrifuj edildi.
- Süpernatant yavaşça döküldü ve tüpler kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kondu.
- Etüvde 37°C'de 10 dakika kurumaya bırakıldı.
- Süre sonunda pellet 10 µl nükleaz-free distile su veya TE tamponuyla süspanse edildi.

### 3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulaması

PCR, tek bir molekül DNA'yı dahi çoğaltabileceğinden, reaksiyon karışımlarının DNA molekülleri ile kontamine olmasının engellenmesi gerekmektedir. Bu kontaminasyon, daha önceki PCR reaksiyonu, eksojen DNA veya diğer hücrel materyallerden kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle, kullanılan sarf malzemeleri ve solüsyonların steril olmasına dikkat edildi. Ayrıca PCR reaksiyonunda, ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için, ince duvarlı DNAase ve RNAase enzimlerinden arındırılmış steril 0,5 ml'lik eppendorf tüpleri kullanıldı. Reaksiyonun gerçekleştirilmesi için de Thermal Cycler cihazı ile 0,5-10µL, 10-100µL ve 50-200µL 'lik pipetler kullanıldı.

$p15^{INK4B}$  geninin promotör bölgesindeki metilasyon, Polimeraz Zincir Yöntemi ile belirlendi. Çalışmada kullanılan primerler, Herman ve ark.'nın yaptığı araştırma makalelerinden seçildi (88).  $p15^{INK4B}$  genindeki metilasyonun PCR ile belirlenmesinde

wild metilasyon spesifik, metilasyon spesifik olmayan primerler (Çizelge 3.1) kullanıldı.

**Çizelge 3.1.** *p15<sup>INK4B</sup>* genindeki metilasyonun PCR ile belirlenmesinde kullanılan primerler.

<b>Sense Primer Dizisi</b>	<b>Antisense primer dizisi</b>	<b>PCR ürünü</b>
<b>P15 W-5'-CGCACCTGCGGCCAGA-3'</b>	<b>P15 W-5'-AGTGGCCGAGCGGCCGG-3'</b>	137
<b>P15 M-5'-GCGTTCGTATTTTGC GGTT-3'</b>	<b>P15 M-5'-CGTACAATAACCGAACGACCGA-3'</b>	148
<b>P15 U-5'-TGTGATGTGTTTGTATTTGTGGTT-3'</b>	<b>P15 U-5'-CCATACAATAACCAAACAACCAA-3'</b>	154

Hot start amplifikasyonu reaksiyonda kullanılan temel bileşiklerden biri olan primerlerin tüp sıcaklığı 65°C'ye yükseldikten sonra karışıma ilave edilmesi ile gerçekleştirildi. Böylece non-spesifik bağlanma ihtimali azaltıldı. Her bir örnek için PCR karışımı Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'deki gibidir.

**Çizelge 3.2.** Metilasyon spesifik PCR karışımları.

<b>Metilasyon spesifik PCR</b>	
<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>Kullanılacak Miktar (µl)</b>
Distile Su	15,14
10X PCR Buffer (amonyum sülfatlı)	4,46
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	13,4
dNTP Mix (10 mM)	6
Primer 1 (Forward) (50pmol/µl)	0,5
Primer 2 (Reverse) (50pmol/µl)	0,5
Modifiye DNA örneği	5
Taq DNA polimeraz karışımı	
Taq DNA Polimeraz	0,25
Distile Su	4,75

**Çizelge 3.3.** Metilasyon spesifik olmayan ve wild-tip PCR reaksiyon karışımları.

<b>Metilasyon spesifik olmayan ve wild-tip PCR</b>	
<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>Kullanılacak Miktar (<math>\mu</math>l)</b>
Distile Su	15,14
10X PCR Buffer (amonyum sülfatlı)	4,46
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	13,4
dNTP Mix (10 mM)	6
Primer 1 (Forward) (50pmol/ $\mu$ l)	0,5
Primer 2 (Reverse) (50pmol/ $\mu$ l)	0,5
DNA örneği	5
Taq DNA polimeraz karışımı	
Taq DNA Polimeraz	0,25
Distile Su	4,75

Oluşturulan bu PCR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait ve üzerlerinde numaraları yazılı steril 0,2  $\mu$ l'lik PCR tüplerine 40'ar  $\mu$ l konuldu. Daha sonra üzerine 5  $\mu$ l DNA örneği konulup cihaza yerleştirildi. Isı 65°C'nin üzerine çıktıktan sonra thermal cyler'in kapağı açılıp tüpler cihazda iken tüplerin üzerine hazırlanan Taq DNA Polimeraz karışımından 5'er  $\mu$ l hızlıca ilave edildi. Tüplerin kapakları yeniden kapatılıp, cihazın kapağı geri kapatıldı.

*p15<sup>INK4B</sup>* geni ve wild tip için PCR koşulları sırasıyla Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'deki gibi uygulanmıştır.

**Çizelge 3.4.** Metilasyon spesifik ve spesifik olmayan PCR’da uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri.

<b>Metilasyon spesifik ve metilasyon spesifik olmayan PCR koşulları</b>			
<b>Reaksiyon Aşaması</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre (dk)</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	95	6	1
Denatürasyon	95	30 sn	35
Primer bağlanması (Annealing)	60	30 sn	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	30 sn	
Son uzama (Post elongasyon)	72	5	1
Muhafaza	4	∞	∞

**Çizelge 3.5.** Wild-tip PCR’da uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri.

<b>Wild-tip PCR koşulları</b>			
<b>Reaksiyon Aşaması</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre (dk)</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	95	6	1
Denatürasyon	95	30 sn	35
Primer bağlanması (Annealing)	65	30 sn	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	30 sn	
Son uzama (Post elongasyon)	72	5	1
Muhafaza	4	∞	∞

PCR ürünleri elektroforez işlemlerinde kullanılmak üzere +4°C’de saklandı.

### 3.3.5. Agaroz Jel Elektroforez Tekniği

Her bir birey için, PCR işlemi sonrasında  $p15^{INK4B}$  geninin amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için agaroz jel elektroforez işlemi uygulandı. Bu işlem sonrasında 148 bp'lik tek bir band gözlenmesi gerekiyordu. Hazırlanan jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, büyüklükleri belli (100-1000b) DNA fragmentleri içeren markır ile kıyaslanarak saptandı.

Tank tamponu olarak TBE (Tris-Borik Asit-EDTA), 10X konsantre stok solüsyon şeklinde hazırlandı. Daha sonra 1X olacak şekilde sulandırıldı ve hem tankta hem de agaroz jelin hazırlanması sırasında kullanıldı.

#### 3.3.5.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

% 2'lik agaroz jel hazırlandı. Düşük erime sıcaklığına sahip (55-60°C) ve moleküler biyolojik çalışmalar için uygun nitelikte agaroz (Agarose Basica LE, Prona) kullanıldı. 2,4 gr agaroz, 120 ml 1X TBE zeltisi içerisinde mikrodalga fırında homojen ve şeffaf bir görünüm elde edilinceye kadar ısıtıldı. Buhar çıkması durduktan sonra boyar madde olarak 0,5μg/ml Ethidium bromide (Et-Br) kullanıldı.

Hazırlanan agaroz, TBE ve Ethidium bromide karışımı, jel taraklarını eritmeyecek ısıya düşmesini sağlamak için jelin biraz soğuması beklendi. Jel taraklarının yerleştirildiği jel kalıbına yavaşça döküldü. Dökme işlemi sırasında jel içinde hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edildi. Yaklaşık 1 saat kadar oda ısısında soğumaya bırakıldı. Jel tamamen katılaştıktan sonra taraklar çıkarıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı içerisine yerleştirilen jelin st kısmını tamamen örtecek şekilde yürütme tamponu ile dolduruldu.

Yürütülecek olan PCR örneklerinden 8'er μl alınarak parafilm üzerinde 10 μl Orange G boyası ile iyice karıştırıldı. Orange G boyası gliserol içerdiğinden dolayı, kuyucuklara yükleme sırasında örneklerin yoğunlaşarak dibe çökmesini sağlamaktadır ve bu şekilde örneklerin taşmasını engellediğinden dolayı tercih edilmiştir.

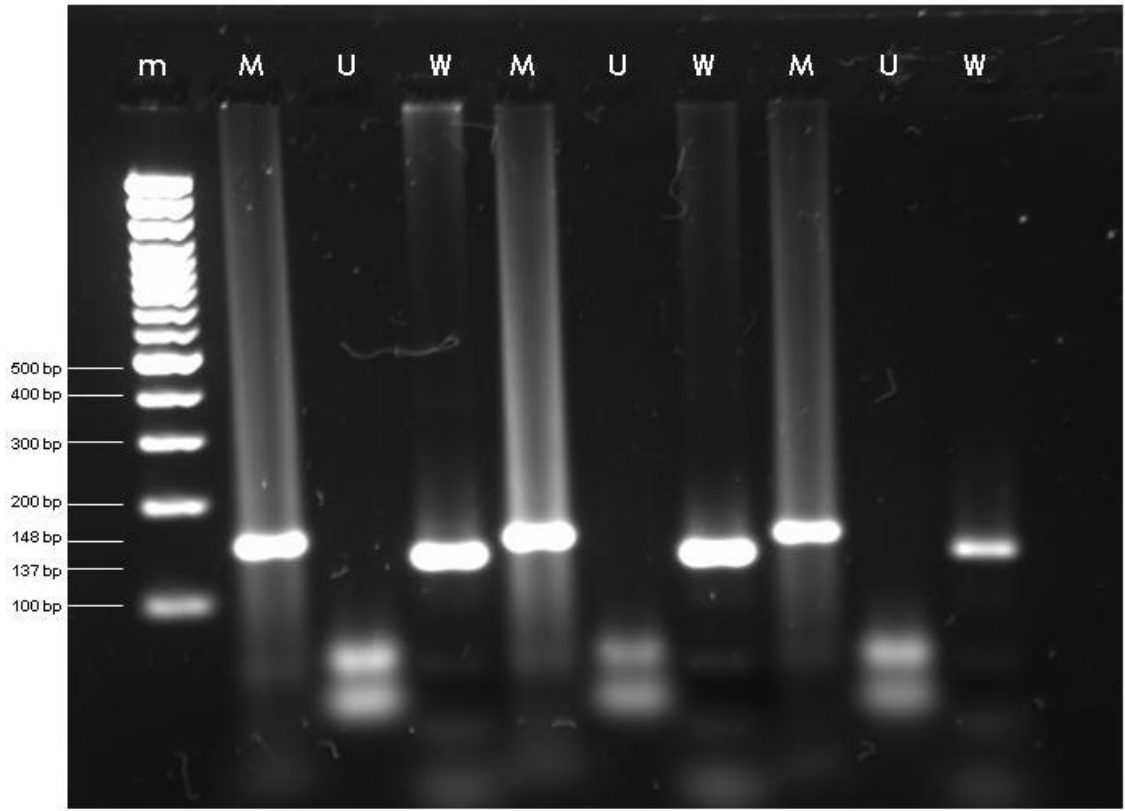
## 4. BULGULAR

Bu çalışma, Non-Hodgkin lenfoma tanısı konmuş 62 hasta ile kontrol grubu olarak 40 sağlıklı bireyi kapsamaktadır. Hastalardan alınan kan örneklerinin DNA'ları izole edildi ve *p15<sup>INK4B</sup>* genindeki metilasyonu saptamak için öncelikle izole edilen DNA'lara bisülfid modifikasyon yöntemi uygulandı. Metillenmiş DNA'daki sitozinler→timine, metillenmemiş DNA'daki sitozinler→urasil→timin'e deamine olabilmektedir. Replikasyondan önce bu değişim urasil DNA glikosilaz enzimi ile urasil→sitozine tamir edilebilir. Ancak DNA replike olduğunda urasil→timine geri dönüşümsüz olarak deamine olmaktadır. *p15<sup>INK4B</sup>* promotöründeki metilasyona bağlı olarak ortaya çıkan bu değişiklikler metilasyon spesifik PCR ile belirlendi.

Metilasyonun PCR ile belirlenmesinde metilasyon spesifik, metilasyon spesifik olmayan ve wild tip primerler kullanıldı. PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelinde yapılan elektroforez ile analiz edildi. Bisülfid modifikasyonuna uğratılmış DNA'lar metilasyon spesifik primerler ile amplifiye edildiğinde, *p15<sup>INK4B</sup>* promotöründe metilasyon varlığında 148 bp'lik PCR ürünü vermektedir (Şekil 4.1). Toplam 62 örnekten 10 (% 16)'unda 148 bp'lik ürün elde edildi ve bu örnekler metilasyon bakımından pozitif olarak değerlendirildi. Tüm örnekler aynı zamanda metilasyon spesifik olmayan (unmethylation) spesifik primerlerle de çalışıldı. Bu primerlerle elde edilen DNA ürünleri 152 bp'lik ürünler vermektedir (Şekil 4.2).

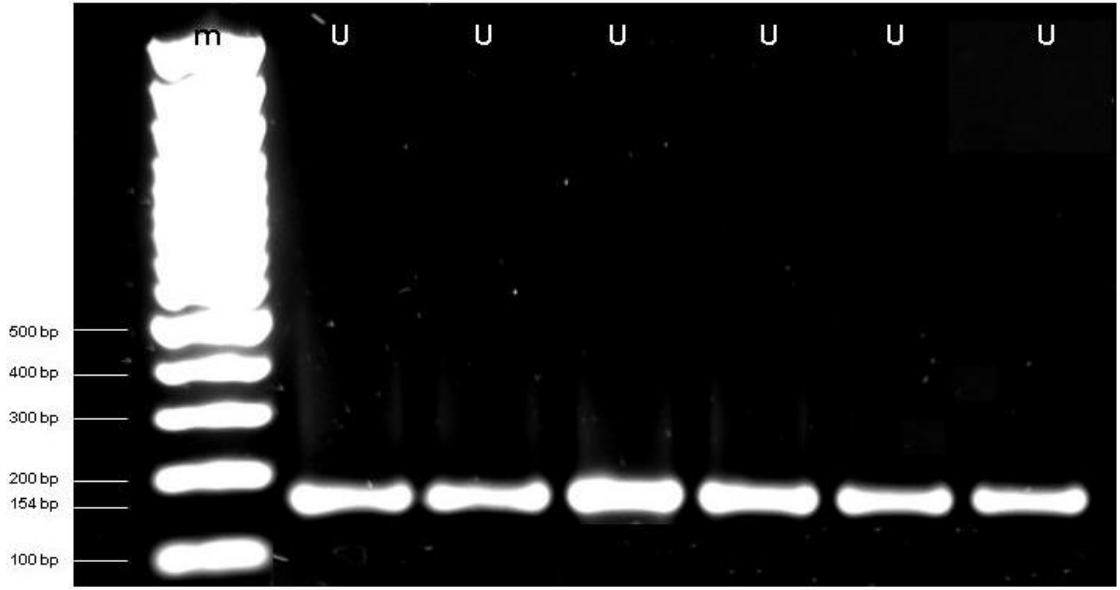
Tüm örnekler aynı zamanda wild tip spesifik primerlerle de çalışıldı. Bu primerlerle yapılan amplifikasyonda bisülfid modifikasyonuna uğratılmamış DNA kullanıldı ve 137 bp'lik PCR ürünü elde edildi (Şekil 4.1).





**m:** molekül ağırlığı markırı  
**M:**metilasyon spesifik primerler ile yapılan PCR  
**U:** Unmetilasyon spesifik primerler ile yapılan PCR  
**W:** Wild primerler ile yapılan PCR

**Şekil 4.1.** *p15<sup>INK4B</sup>* Metilasyon spesifik, unmetilasyon spesifik ve wild tip spesifik primerler ile yapılan PCR amplifikasyonu ve elde edilen ürünlerin % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile analizi.



**m:markır, U: Unmetilasyon spesifik primerlerle yapılan PCR**

**Şekil 4.2.** Unmetil primerler kullanılarak MSP yöntemi ile amplifiye edilen 154 bp'lık *p15<sup>INK4B</sup>* geni fragmentlerinin % 2'lik agaroz jel görüntüsü.

Sonuç olarak; Non-Hodgkin lenfomalı bireylerin, *p15<sup>INK4B</sup>* genindeki hipermetilasyon oranı % 16 olarak bulundu. Bu hastalarda DNA metilasyonun görülme oranı erkeklerde % 13.5 iken, kadınlarda bu oran % 17.8 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1- 4.2).

**Çizelge 4.1.** NHL'lı olguların  $p15^{INK4B}$  genindeki metilasyon durumları.

Hasta Grubu n: 62	Cinsiyet	$p15^{INK4B}$ Metilasyon (+)	$p15^{INK4B}$ Unmetilasyon (-)
Hasta no: 1	E	-	+
Hasta no: 2	K	-	+
Hasta no: 3	K	-	+
Hasta no: 4	E	-	+
Hasta no: 5	E	-	+
Hasta no: 6	E	-	+
Hasta no: 7	K	-	+
Hasta no: 8	K	-	+
Hasta no: 9	E	-	+
Hasta no: 10	E	-	+
Hasta no: 11	K	+	-
Hasta no: 12	K	+	-
Hasta no: 13	K	-	+
Hasta no: 14	E	-	+
Hasta no: 15	E	-	+
Hasta no: 16	E	-	+
Hasta no: 17	K	-	+
Hasta no: 18	K	-	+
Hasta no: 19	K	-	+
Hasta no: 20	K	-	+
Hasta no: 21	E	-	+
Hasta no: 22	K	-	+
Hasta no: 23	E	+	-
Hasta no: 24	K	-	+
Hasta no: 25	K	-	+
Hasta no: 26	E	-	+
Hasta no: 27	E	-	+
Hasta no: 28	E	-	+
Hasta no: 29	K	-	+
Hasta no: 30	E	-	+
Hasta no: 31	E	-	+
Hasta no: 32	K	+	-
Hasta no: 33	K	+	-
Hasta no: 34	E	-	+
Hasta no: 35	E	-	+
Hasta no: 36	E	+	-
Hasta no: 37	K	-	+
Hasta no: 38	E	-	+
Hasta no: 39	E	+	-
Hasta no: 40	K	+	-
Hasta no: 41	E	-	+
Hasta no: 42	K	-	+
Hasta no: 43	E	+	-
Hasta no: 44	E	-	+
Hasta no: 45	E	-	+
Hasta no: 46	E	-	+
Hasta no: 47	E	-	+
Hasta no: 48	E	-	+
Hasta no: 49	K	-	+
Hasta no: 50	E	-	+
Hasta no: 51	E	-	+
Hasta no: 52	E	-	+
Hasta no: 53	E	-	+
Hasta no: 54	E	-	+
Hasta no: 55	E	-	+
Hasta no: 56	E	-	+
Hasta no: 57	E	-	+
Hasta no: 58	E	-	+
Hasta no: 59	K	-	+
Hasta no: 60	E	-	+
Hasta no: 61	E	+	-
Hasta no: 62	E	-	+
<b>Toplam: 62</b>		<b>10</b>	<b>52</b>

**Çizelge 4.2.** NHL'lı olguların cinsiyete göre yaş ortalamaları ve metilasyon yüzdeleri.

	<b>Yaş Ortalaması</b>	<b>Metilasyon %'si</b>
<b>Kadın</b>	46,13±18,3	17.8
<b>Erkek</b>	43,00±15,9	13.5

Hasta ve kontrol grubunda  $p15^{INK4B}$  genindeki metilasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3.** NHL'lı olgularda ve kontrol grubunda  $p15^{INK4B}$  genindeki metilasyon yüzdeleri.

	<b>Metilasyon % (+)</b>	<b>Metilasyon % (-)</b>
<b>Hasta n=62</b>	16	84
<b>Kontrol n=40</b>	-	100

## 5. TARTIŞMA

Son beş yıldır DNA metilasyonu ve özellikle kanser gelişimindeki rolü üzerine yapılan çalışmaların sayısında ciddi bir artış olmuştur. Bu süre zarfında bilinen DNMT'lerin sayısı yeni keşfedilenlerle beraber birden üçe çıkmış ve metilasyonların transkripsiyonel inaktivasyon mekanizmaları üzerine olan etkisi netleştirilmeye başlanmıştır. Buna rağmen metilasyonel değişiklik mekanizmaları hakkındaki bilgilerimizde hala bazı eksiklikler vardır. Bu mekanizmaların tanımlanması, yakın gelecekte bu alandaki kapsamlı araştırmaların daha ayrıntılı yapılmasına imkan verecek ve etyolojinin aydınlanmasına katkıda bulunarak klinikte kanser hastalarının erken tanı ve tedavisine fayda sağlayacaktır (9).

Lenfoma, lösemi ve multipl myeloma kanserleri hematopoetik ya da lenfoid doku orijinlidir. Amerika'da yapılan çalışmalara göre 106.200 kişinin 61.000'ini lenfoma, 30.600'ünü lösemi ve 14.000'ünü multipl myeloma oluşturmaktadır. Hematolojik malignensilerin bu yeni olguları 2003'te yeni kanser olgularının % 8'ini oluşturmaktadır. Hematolojik malignensiler, kanser ölümlerinde ikinci sırada yer almaktadır. Lösemiler akut ve kronik olmak üzere iki temel alt gruba ayrılırken, lenfomalar Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfoma olmak üzere sınıflandırılır (89).

Farklı hücrel onkogenlerden başka tümör supressor genlerinin disregülasyonu kanserin patojenezisinde önemli bir olaydır. Tümör supressör genler, özellikle hücre siklus regülasyonunda görev alırlar. Sıklıkla kanserin farklı tiplerinde inaktiftir. *CDKN2A* (*p16<sup>INK4A</sup>*, *MTS1*), *CDKN2B* (*p15<sup>INK4B</sup>*, *MTS2*) CDK inhibitörleridir. Siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin INK 4 kinaz ailesine aittir ve Rb bağımlı hücre siklus regülasyonunda CDK4-6'nın kompetatif inhibisyonuyla hücre siklusunun negatif regülatörleridir (90).

Bu çalışmada, NHL'lı hastaların *p15<sup>INK4B</sup>* gen promotöründeki metilasyonun varlığı ve sıklığı saptanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, uzman hekim tarafından NHL tanısı konmuş olan 62 hasta seçilmiş ve elde edilen veriler neticesinde, NHL'lı 62 bireyin 10'unun (% 16) *p15<sup>INK4B</sup>* promotör gen bölgesinde metilasyon saptanmıştır.

Delgado ve ark. 72 NHL'lı olguda *p15<sup>INK4B</sup>* ve *p16<sup>INK4A</sup>* genindeki DNA metilasyonunu araştırmışlardır. NHL'lı olguların % 11'inde (8 birey) *p15<sup>INK4B</sup>* geninde

metilasyon gözlenmiştir Bu olguların çoğunda (3 MALT, 1 anaplastik T-hücreli lenfoma, 1 burkit ve 1 foliküler lenfoma)  $p16^{INK4A}$  genindeki hipermetilasyonun varlığında gösterilmiştir (73).

Başka bir metilasyon çalışmasında, Non-hodgkin lenfomalarda  $p16^{INK4A}$  genindeki hipermetilasyonun (%15-80),  $p15^{INK4B}$  (% 10) genine oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak AML ve ALL'de  $p16^{INK4A}$  genindeki hipermetilasyona çok nadir rastlanmıştır. Aberant  $p15^{INK4B}$  promotör metilasyon AML'nin hemen hemen tamamında saptanırken, ALL ve Burkitt lenfomada çok sık bir şekilde metilasyona rastlandığı gösterilmiştir. Multipl myelomada;  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$ 'daki metilasyon sıklığı hastaların % 67 ve % 75'inde saptanmıştır (91).

Literatürde  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$  genlerinin metilasyonu ile ilgili farklı hasta gruplarında yapılan çalışmalarda metilasyon oranlarında farklılıklar bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda hastalardan alınan kemik iliği ve lenf nodu örneklerinde tam kana göre metilasyon oranının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Takahashi ve arkadaşları bu oranları farklı genlerde % 29- % 68 arasında bulmuşlardır (89).

Baur ve ark. yapmış oldukları çalışmada  $p15^{INK4B}$ ,  $p16^{INK4A}$  ve  $p14^{ARF}$  genlerinin metilasyon durumlarını kemik iliği ve lenf nodu örneklerinde 56 B ve T hücre lenfomalı hastada araştırmışlardır. Buna göre;  $p16^{INK4A}$  genindeki metilasyon, lenfomalı 56 hastanın 17'sinde (%30) bulunmuştur. BCL'da % 32 ve TCL'da % 22 oranında metilasyon belirlenmiştir. BCL'nin düşük dereceli tipinde % 21 bulunurken yüksek dereceli tipinde (Kiel sınıflandırma) % 50 olarak gösterilmiştir.  $p15^{INK4B}$  geninde metilasyon lenfomalı olguların % 61'inde bulunmuştur: BCL'da % 64 ve TCL'de ise % 44 oranında metilasyon gösterilmiştir. BCL'nin düşük dereceli alt tipinde metilasyon oranı % 55, yüksek dereceli alt tipinde ise % 78 olarak bulunmuştur (92). Lenfomalı olguların hiç birinde  $p14^{ARF}$  genindeki metilasyona rastlanmamıştır.  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$ 'nın kodlanan bölgelerinde hiç mutasyona rastlanmamış ve lenfoma oluşumunda homozigot delesyonlar ile mutasyonların, bu genlerin inaktivasyon durumu ile ilgili olmadıkları belirlenmiştir. Bu araştırmacılar lenfomalarda  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$ 'nın transkripsiyonel inaktivasyonunda esas mekanizmanın gen metilasyonu olduğunu bildirilmişlerdir (92).

Wang ve ark. yapmış oldukları çalışmada;  $p16^{INK4A}$ 'daki delesyonlar ve nokta mutasyonlarının AMM'li hastalarda nadir olarak gözlemişlerdir. Mevcut çalışmalarda

bu genlerdeki inaktivasyona başka bir mekanizmasıyla  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$ 'daki metilasyon durumlarına bakılmıştır. Metilasyon spesifik PCR ve southern blott teknikleri kullanılarak, AMM'nin kronik fazında  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$  da hipermetilasyona hiç bir hastada rastlanmamıştır. Lösemide  $p15^{INK4B}$  geninde hipermetilasyon % 40,  $p16^{INK4A}$  da ise % 20 oranında bulunmuştur. Homozigot delesyonların  $p16^{INK4A}$  geninde  $p15^{INK4B}$  geninden daha sık oranda olduğu gözlenirken, T-hücre ALL 'de  $p15^{INK4B}$ 'deki hipermetilasyon oranının  $p16^{INK4A}$  daki hipermetilasyon oranından daha sık olduğu saptanmıştır. Özellikle transformasyon aşamasında  $p15^{INK4B}$  genindeki hipermetilasyonun AML ve MDS'de daha yüksek olduğu bulunmuştur. Diğer yandan, lenfoid malignensilerde primer ya da trasforme agresif varyantlarda ve Burkitt lenfomada  $p16^{INK4A}$  daki hipermetilasyonun çok daha sık olduğu tespit edilmiştir.  $p16^{INK4A}$ 'nın hipermetilasyonu özellikle plazma hücre lösemisinde multiple myelomada yüksek oranda saptanmıştır. Bununla birlikte  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$  daki hipermetilasyon; MDS gibi primer agresif hastalıklar, lenfomanın agresif formları ya da akut lösemide transforme lenfomalar ile lenfomanın daha agresif tiplerinde gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarda  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$  da hipermetilasyon kronik AMM'de gözlenmemiştir. Fakat lösemik faz transformasyonunda  $p15^{INK4B}$  de % 40,  $p16^{INK4A}$  da ise % 20 oranında bulunmuştur (93).

B. Martinez-Delgado ve ark.'nın yaptıkları çalışmada,  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$  daki hipermetilasyona, NHL'da çok sık olarak rastlanmıştır. Bu tümörlerde homozigot delesyonların ve mutasyonların çok düşük oranda olduğu gözlenmiştir.  $p16^{INK4A}$  nın metilasyonu, olguların histolojik alt tiplerine bağlı olarak % 10-80'inde bulunmuştur.  $p15^{INK4B}$  genindeki hipermetilasyon düşük oranda gözlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda, bu genlerin hipermetilasyonunun hematolojik malignesilerde prognostik bir faktör olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (7).

Yapılan çalışmalarda, çoğu kanserle ilişkili genler insan neoplazmalarının birçok tipinde metillenmiştir.  $p16^{INK4A}$ 'nın CpG adacıklarındaki hipermetilasyonu gliomas, melanomas, lösemi ve lenfomaların yanı sıra kolon, mesane, göğüs ve akciğer karsinomalarında rapor edilmiştir.  $p15^{INK4B}$  promotör bölgesinde de hipermetilasyon olup, özellikle hematolojik malignensileri kapsamaktadır. Lenfomalarda  $p15^{INK4B}$  ve  $p16^{INK4A}$  değişimleri homozigot delesyonlar ve mutasyonlarda düşük oranda belirlenmiştir. Bu tümör supressör genlerinin CpG adacıklarındaki hipermetilasyonu

lenfoid neoplazmlarda çok sık bir şekilde oluşmaktadır.  $p15^{INK4B}$  ya da  $p16^{INK4A}$  da hipermetilasyon mukoza ile ilişkili lenfoid doku lenfomalarında Burkitt lenfomada ve multipl myelomada gözlenmiştir. Metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu ya da bisülfid genomik dizisi gibi hassas teknikler kullanılarak metilasyon oranı farklı olgularda analiz edilmiştir (93). Garcia ve ark. yapmış oldukları çalışmada,  $p15^{INK4B}$  genin promotör bölgesindeki hipermetilasyon null ALCL de % 58, T-hücre ALCL'de % 61, PTCL'de % 77 ve DLBCL'de % 47 oranında saptanmıştır. NHL'da toplam metilasyon sıklığının oranı % 60 olarak analiz edilmiştir (94).

*Rb* ve *p53* gibi çoğu tümör supressör genler bir alleldeki nokta mutasyonu ve kromozomal kayıpla homolog allellerin delesyonlarına karşın, AML'de  $p15^{INK4B}$  gen inaktivasyonundaki esas mekanizma genin 5' promotör bölgesinde metilasyon meydana gelmektedir. AML'de  $p15^{INK4B}$  promotör geninde homolog delesyon ve intrajenik mutasyonlar nadirdir. Benzer şekilde homolog delesyonlar ve intrajenik mutasyonlar tarafından  $p16^{INK4A}$ 'nın inaktivasyonu AML'de yaygın değildir. Buna rağmen ALL olgularında bu yaklaşık olarak % 30 oranında meydana gelmektedir (90).

Farklı genlerde de metilasyona bakılmış, buna göre; *ER* (östrojen reseptör) geninde, ALL, AML, CML ve lenfomalarda metilasyon gözlenmiştir. ER geninde NHL'da metilasyon % 60 olarak bulunmuştur. *HIC-1* geni sıklıkla metillenmekte ve solid tümörlerin çoğunda sessizleşmektedir. AML'de nadir olarak metilasyon saptanırken (% 10), ALL'de ki metilasyonun (% 53) daha sık olduğu belirlenmiştir. Yine *HIC-1* genindeki metilasyon, Non-Hodgkin Lenfomada % 25, CML-CP'de ise % 50 olarak bulunmuştur. *E-CAD* (*E-cadherin*) geninde AML'de % 82, ALL'de % 100 ve CLL'li hastaların % 60'ında metilasyonun varlığı tespit edilmiştir. *p73* geninde ALL'de % 31, Burkitt lenfomada % 30 oranında metilasyon saptanmıştır. *CALC* (*kalsitonin*) genindeki metilasyonun ise AML'de % 71, ALL'de ve NHL'da ise % 90 oranında metilasyon belirlenmiştir (9).

Kumagai ve ark., metilasyon spesifik PCR yöntemi ile myeloid metaplasia'lı ve melofibrosis'li 30 hastada tümörle ilişkili 8 genin ( $p14^{ARF}$ ,  $p15^{INK4B}$ ,  $p16^{INK4A}$ , *Rb*, *hMLH1*, *hMSH2*, *APC* ve *DAPK*) metilasyon durumunu analiz etmişlerdir. Buna göre,  $p16^{INK4A}$ , *Rb*, *hMLH1*, *hMSH2*, *APC* ve *DAPK* genlerinde hipermetilasyon görülmemiştir.  $p14^{ARF}$  ve  $p15^{INK4B}$  genlerinde sadece 1 hastada hipermetilasyon saptanmıştır (95).



Hofmann ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada; hücre siklus kontrol genleri olan *p15<sup>INK4B</sup>* ve *p16<sup>INK4A</sup>* da metilasyon T-hücre lösemi ve lenfomalı hastalarda % 20 olarak bulunmuştur (96).

Promotör CpG adacıklarının aberant metilasyonu epigenetik, onkogenik bir mekanizmadır. Manero ve ark. yapmış oldukları çalışmada, ALL'li hastaların metilasyon karakteristikleri tanımlanmıştır. Restriksiyon endonükleaz enzimi (COBRA) ile bisüfit PCR yöntemi kullanılarak 80 tedavi almamış ALL'li hastada promotör CpG adacıkları ile ilişkili 10 genin metilasyon durumu analiz edilmiştir. *MDR1*, *THBS2*, *MYF3*, *ER*, *p15<sup>INK4B</sup>*, *THBS1*, *CD10*, *C-ABL* ve *p16<sup>INK4A</sup>* genlerindeki metilasyon yoğunluğu, sırasıyla % 24,5, % 20,8, %17,6, % 16,1, % 11,3, % 8,9 , % 4,5, % 3,7 ve % 1,3 olarak bulunmuştur. *p53* geninde ise 80 olgunun 17'sinde (% 21.2) metilasyon belirlenmiştir. Olguların % 86.2'sinde en az bir gende metilasyon saptanırken, olguların % 42,5'inde üç ya da daha fazla gende metilasyonun varlığı saptanmıştır (97).

Bir çok kanser tipinde önemli fonksiyonlara sahip olan genlerin promotörlerinde metilasyonun gösterilmesi ile yeni tedavi stratejileri geliştirilmeye başlanmıştır. Bunun sonucu olarak kemoterapide kullanılan ilaçların bazıları DNA metilasyonunda değişimlere neden olan tümörlerin tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Proarbazin, metotreksat, hidroksiüre ya da 5-florourasil gibi ilaçlara maruz kalındığında bazı tümörlerde DNA metilasyonu indüklemektedir. Diğer kemoterapi ilaçları, antimetabolitler 5-azadeoksisitidin ya da 6-tiyoguanin DNA'nın hipometilasyonuna neden olmaktadır. Lenfomaların tedavisinde kullanılan ilaçların bazıları, bazı genlerin anormal metilasyonunun devam etmesine neden olmaktadır. Kemoterapide kullanılan 5-azasitidin gibi hipometilasyon ajanları, hipermetilasyon ile tümör supressör genlerin yeniden ekspresyonuna neden olabileceği belirtilmiştir. NHL'da kemoterapide kullanılan ilaçlarla tedavi süresince metilasyonun devam ettiği gözlenmiştir (7).

Sonuç olarak birçok NHL'lı olgularda metilasyon oranı *CALC*, *ER*, *p15<sup>INK4B</sup>* ve *p16<sup>INK4A</sup>* geninde farklı oranlarda belirlenmiştir. Ancak çalışılan materyalin çeşidi ile metilasyon tespit oranları farklılık göstermektedir. Kemik iliği ve lenf nodu örneklerinde % 60-78 oranında metilasyon tesbit edilirken periferel kandan yapılan çalışmalarda bu oran (% 10-20) arasında bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da periferel kan örnekleri kullanıldığından dolayı bu oran (% 16) literatüre göre biraz düşük görülmektedir. Bu hastalara ait lenf nodu örneklerinde de *p15<sup>INK4B</sup>* deki metilasyonun

araştırılması bu oranı yükseltecektir. NHL'larda metilasyonun araştırılmasında daha yüksek düzeylerde metillendiği tespit edilen *CALC*, *ER* gibi diğer bazı genlerdeki metillenme oranlarının da araştırılması bu oranı yükseltecek ve daha duyarlı bir erken tanı imkanı sağlayacaktır.

Bu alanda yapılacak deneylerin optimize edilmesi ve uygun örneklerin kullanılması ile metilasyonun tesbit edilmesi birçok kanser türünde olduğu gibi NHL içinde erken ve hassas bir tanı kriteri sağlayarak tedaviye fayda sağlayacaktır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanserin erken teşhisi için yeni girişimlere ve sürekli yenilenen bulgulara ihtiyaç vardır. Son zamanlarda genetiğin yanı sıra epigenetik kavramı, insan kanser evriminin merkezi olayları olarak yeniden ortaya çıkmıştır. Bir çok kanser türü, fonksiyonel genlerin promotör bölgelerinde meydana gelen metilasyonlar ve bu metilasyonlar sonucunda ortaya çıkan genetik değişikliklerin bir sonucu olarak genlerin fonksiyonlarını kaybetmesi veya onkogenlerin aktive olması ile gelişmektedir.

Metilasyon değişimlerinin tespiti potansiyel olarak risk durumlarının belirlenmesi, stratejilerin izlenmesi, erken teşhis ve kanserin prognozunu gözlemlenmede kullanılan hassas bir moleküler markıdır. Yakın gelecekte DNA metilasyon paterninin önemi, kanser hastalarının tedavisinde giderek artacaktır. Hipermetilasyonun tesbit edilmesi konvansiyonel olarak kullanılan sınırlı sayıdaki markırlara önemli bir destek oluşturacaktır.

Ayrıca metilasyon varlığı ve sonucunda gelişen fonksiyon kayıplarının netleşmeye başlamasıyla beraber DNMT'lere karşı çeşitli bazı ajanlar geliştirilmiş ve klinik olarak kullanılmaya başlanmış, bazıları ise deneme aşamasındadır. Bu çalışmaların devam ettirilmesi ile daha etkin ve az yan etkiye sahip yeni ajanların geliştirilmesi de mümkün olacaktır.

Yapılan bu çalışmada, 62 NHL olgusunda *p15<sup>INK4B</sup>* geninin promotöründeki metilasyon oranı araştırılmış ve bu oran % 16 olarak bulunmuştur. Kontrol grubu olarak 40 sağlıklı birey değerlendirilmeye alınmıştır. NHL'lı hastalarda DNA metilasyonunun görülme sıklığı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Bundan sonra yapılması düşünülen çalışmalarda örnek sayısının arttırılması, doku örneklerinin kullanılması ve diğer bazı başka genlerin de araştırılması ile daha hassas sonuçlar elde edilebilecektir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Davis CD, Uthus EO.** DNA methylation, Cancer Susceptibility and Nutrient Interactions. *The Society for Experimental Biology and Medicine*, **2004**;229(10):988-995.
2. **Tsellou E, Troungos C, Moschovi M, Athanasiadou-Piperopoulou F, Polychronopoulou S, Kosmidis H, Kalmanti M, Hatzakis A, Dessypris N, Kalofoutis A, Petridou E.** Hypermethylation of CpG islands in the promoter region of the p15INK4B gene in childhood acute leukaemia. *European Journal of Cancer*, **2005**;41(4):584–589.
3. **Das PM, Signal R.** DNA methylation and cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **2004**;22:4632-4642.
4. **Rogers BB.** Overview of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Seminars in Oncology Nursing*, **2006**;22(2):67-72.
5. **Kern WF.** PDQ Hematoloji, 1. baskı, İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, **2005**;221-225.
6. **Tien HF, Tang JL, Tsay W, Liu MC, Lee FY, Wang CH, Chen YC, Shen MC.** Methylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *British Journal of Haematology*, **2001**;112(1):148-154.
7. **Martinez-Delgado B, Richart A, Garcia MJ, Robledo M, Osorio A, Cebrian A, Rivas C, Benitez J.** Hypermethylation of P16ink4a and P15ink4b genes as a marker of disease in the follow-up of non-Hodgkin's lymphomas. Spain. *British Journal of Haematology*, **2000**;109(1):97-103.
8. **Singal R, Ginder GD.** DNA methylation. *Blood*, **1999**;93(12):4059-4070.
9. **Strathdee G, Brown R.** Aberrant DNA methylation in Cancer: potential clinical interventions. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, **2002**;4:1-17.
10. **Baylin SB.** Tying it all together: Epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer. *Science*, **1997**;277(5334):1948-1949.
11. **Bird AP.** DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Sci Res*, **1980**;8(7):1499-1504.
12. **Ramsahoye BD, Davies CS, Mills KI.** DNA methylation: biology and significance. *Blood Rev*, **1997**;10(4):249-261.

13. **Caudill MA, Wang JG, Melnyk S, Pogribny IP, Jernigan S, Collins MD, Santos-Guzman J, Swendseid ME, Cogger EA, James SJ.** Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine Beta-synthase heterozygous mice. *J Nutr*, **2001**;131(11):2811-2818.
14. **Choumenkovitch SF, Selhub J, Bagley PJ, Maeda N, Nadeau MR, Smith DE, Choi SW.** In the cystathionine beta-synthase knockout mouse, elevations in total plasma homocysteine increase tissue S-adenosylhomocysteine, but responses of S-adenosylmethionine and DNA methylation are tissue specific. *J Nutr*, **2002**;132(8) 2157-2160.
15. **Detich N, Hamm S, Just GK, Nox JD, Szyf M.** The methyl donor S- Adenosylmethionine inhibits active demethylation of DNA: a candidate novel mechanism for the pharmacological effects of S-Adenosylmethionine. *J Biol Chem*, **2003**;278(23):20812-20820.
16. **Robertson KD.** DNA methylation and chromatin: Unraveling the tangled web. *Oncogene*, **2002**;21(35):5361-5379.
17. **Szyf M.** Targeting DNA methylation in cancer. *Ageing Res Rev*, **2003**;2(3):299-328.
18. **Antequera F, Boyes J, Bird A.** High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG island in cell lines. *Cell*, **1990**;62:503-514.
19. **Jost JP, Bruhat A.** The formation of DNA methylation patterns and the silencing of genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **1997**;57:217-248.
20. **Monk M.** Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Dev. Genet*, **1995**;17(3):188-197.
21. **Razin A, Riggs AD.** DNA methylation and gene function. *Sci*, **1980**;210(4470):604-610.
22. **Yoder JA, Bestor TH.** Genetic analysis of genomic methylation patterns in plants and mammals. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **1996**;377(10):605-610.
23. **Jones PA.** The DNA methylation paradox. *Trends Genet*, **1999**;15(1):34-37.
24. **Singal R, Wang SZ, Sargent T.** Methylation of promoter proximal-transcribed sequences of an embryonic globin gene inhibits transcription in primary erythroid cells and promotes formation of a cell type-specific methyl cytosine binding complex. *J Biol Chem*, **2002**;277(3):1897-1905.
25. **Tate PH, Bird AP.** Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*, **1993**;3(2):226-231.
26. **Hendrich B, Bird A.** Identification and characterization of family of mammalian methyl CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*, **1998**;18(11):6538-6547.

27. **Kokura K, Kaul SC, Wadhwa R, Nomura T, Khan MM, Shinagawa T, Yasukawa T, Colmenares C, Ishii S.** The ski protein family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem*, **2001**;276(36):34115-34121.
28. **Baylin SB, Herman JG.** DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends Genet*, **2000**;16(4):168-174.
29. **Ehrlich M.** DNA methylation in cancer: Too much, but also too little. *Oncogene*, **2002**;21(35):5400-5413.
30. **Laird PW, Jaenisch R.** The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics. *Annu Rev Genet*, **1996**;30:441-464.
31. **Huang TH, Laux DE, Hamlin BC, Tran P, Tran H, Lubahn DB.** Identification of DNA methylation markers for human breast carcinomas using the methylation-sensitive restriction fingerprinting technique. *Cancer Res*, **1997**;57(6):1030-1034.
32. **Klein CB, Costa M.** DNA methylation, heterochromatin and epigenetic carcinogens. *Mutat Res*, **1997**;386(2):163-180.
33. **Costello JF, Plass C.** Methylation matters. *J. Med. Gene.* **2001**;38(5):285-303
34. **Clark SJ, Melki J.** DNA methylation and gene silencing in cancer: Which is the guilty party? *Oncogene*, **2002**;21(35):5380-5387.
35. **Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG.** Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science*, **2002**;295(5557):1079-1082.
36. **Leone G, Teofili L, Voso MT.** DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. *Haematologica*, **2002**;87(12):1324-1341.
37. **Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO.** Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood*, **2001**;97(9):2823-2829.
38. **Feinberg AP, Vogelstein B.** Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, **1983**;301(5895):89-92.
39. **Kim YI, Giuliano A, Hatch KD, Schneider A, Nour MA, Dallal GE, Selhub J, Mason JB.** Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer*, **1994**;74(3):893-899.

40. **Vachtenheim J, Horako I, Novotna H.** Hypomethylation of CCGG sites in the 3' region of H-ras protooncogene is frequent and is associated with H-ras allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, **1994**;54(5):1145-1148.
41. **De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T.** The activation of human gene *MAGE-1* in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**;93(14):7149-7153.
42. **Leib-Mosch C, Seifarth W.** Evolution and biological significance of human retroelements. *Virus Genes*, **1995**;(2-3):113-145.
43. **Bera TK, Tsukamoto T, Panda DK, Huang T, Guzman RC, Hwang SI, Nandi S.** Defective retrovirus insertion activates c-Ha-ras protooncogene in an MNU-induced rat mammary carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, **1998**;248(3):835-840.
44. **Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B.** DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1997**;94(6):2545-2550.
45. **Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequignot E.** Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*, **1999**;402(6758):187-191.
46. **Qu G, Dubeau L, Narayan A, Yu MC, Ehrlich M.** Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutat Res*, **1999**;423(1-2):91-101
47. **Yan PS, Perry MR, Laux DE, Asare AL, Caldwell CW, Huang TH.** CpG island arrays: an application toward deciphering epigenetic signatures of breast cancer. *Clin Cancer Res*, **2000**;6(4):1432-1438.
48. **Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C.** Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type specific pattern. *Nat Genet*, **2000**;24(2):132-138.
49. **Plass C, Yu F, Yu L, Strout MP, El-Rifai W, Elonen E, Knuutila S, Marcucci G, Young DC, Held WA, Bloomfield CD, Caligiuri MA.** Restriction landmark genome scanning for aberrant methylation in primary refractory and relapsed acute myeloid leukemia; involvement of the *WIT-1* gene. *Oncogene*, **1999**;18(20):3159-3165.
50. **Rush LJ, Dai Z, Smiraglia DJ, Gao X, Wright FA, Fruhwald M, Costello JF, Held WA, Yu L, Krahe R, Kolitz JE, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Plass C.** Novel methylation targets in de novo acute myeloid leukemia with prevalence of chromosome 11 loci. *Blood*, **2001**;97(10):3226-3233.

51. **Dai Z, Lakshmanan RR, Zhu WG, Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, Brena RM, Li B, Wright FA, Ross P, Otterson GA, Plass C.** Global methylation profiling of lung cancer identifies novel methylated genes. *Neoplasia*, **2001**;3(4):314-323.
52. **Fruhwald MC, O'Dorisio MS, Dai Z, Tanner SM, Balster DA, Gao X, Wright FA, Plass C.** Aberrant promoter methylation of previously unidentified target genes is a common abnormality in medulloblastomas-implications for tumor biology and potential clinical utility. *Oncogene*, **2001**;20(36):5033-5042.
53. **Momparler RL, Bovenzi V.** DNA Methylation and Cancer. *Journal of Cellular Physiology*, **2000**;183(2):145-154.
54. **Baylin SB, Hoppener JW, de Bustros A, Steenbergh PH, Lips CJ, Nelkin BD.** DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res*, **1986**;46(6):2917-2922.
55. **Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB.** Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**;93(18):9821-9826.
56. **Toyota M, Issa JP.** CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol*, **1999**;9(5):349-357.
57. **Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP.** Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res*, **1998**;58(23):5489-5494.
58. **Heim S, Mitelman F.** Cancer Cytogenetics. 2<sup>ed</sup>. Ed., Canada: *A John Wiley&Sons Inc.* **1995**;266-309.
59. **Kumar V, Cotran RS, Robbins SL.** Basic Pathology. 6<sup>th</sup>. Ed., Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, **2000**;362-373.
60. **Gascoyne RD, Skinnider BF.** In: Beutler E, Lichtman M, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. Williams Hematology. 6<sup>th</sup>. Ed., New York: Mc Grae Hill, **2001**;1237-1262.
61. **Ottensmeier C.** The classification of lymphomas and leukemias. *Chemico-Biological Interactions*, **2001**;135-136:653-664.
62. **Gaidano G, Dalla-Favera R.** In: Vincent T, DeVita Jr, Hellman S, Steven AR. Cancer: Principles & Practice of Oncology. 5<sup>th</sup>. Ed., Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, **1997**;2131-2232.
63. **Hekimgil Mine.** Küçük B hücreli lenfomalarda ayırıcı tanı ve prognostik özellikler. *Türkiye Klinikleri (J Int Med Sci)*, **2005**;1(36):49-59.



64. **Yunis J, Mayer M, Amesen M.** Bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. *N Engl J Med*, **1989**;320:1047.
65. **Sarpel SC, Paydas S, Tuncer I, Varinli S, Koksall M, Akoglu T.** Non-Hodgkin's Lymphomas in Turkey. *Cancer*, **1988**;62:1653-1657.
66. **Armitage JO.** Staging Non-Hodgkin Lymphoma. *CA Cancer J Clin*, **2005**;55:368-376.
67. **Martinez JD, Parker MT, Fultz KE, Ignatenko NA, Gerner EW.** Molecular Biology of Cancer. 6<sup>th</sup>.Ed., Arizona: John Wiley & Sons, Inc., **2003**;5:2-50.
68. **Taiple M.** Regulation of Mammalian G<sub>1</sub> Cyclin Dependent Kinase Complexes by Transforming Growth Factor- $\beta$ . *Biotechnology and Molecular Biology*, Helsinki: **1999**;9-65.
69. **Nagai H, Kinoshita T, Ichikawa A, Murate T.** Malignant Lymphoma and Tumor Suppressor Genes. *J. Clin Exp Hematopathol*, **2002**;42(1):11-22.
70. **Bisogna M, Calvano JE, Hui Ho G, Orlow I, Cordon-Cardo C, Borgen PI, Van Zee KJ.** Molecular analysis of the *INK4A* and *INK4B* gene loci in human breast cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **2001**;125(2):131-138.
71. **Kusy S, Larsen CJ, Roche J.** p14ARF, p15INK4b and p16INK4a Methylation Status in Chronic Myelogenous Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, **2004**;45(10):1989-1994.
72. **Esteller M.** Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clinical Immunology*, **2003**;109(1):80-88.
73. **Martinez-Delgado B, Robledo M, Arranz E, Osorio A, Garcia MJ, Echezarreta G, Rivas C, Benitez J.** Hypermethylation of p15/ink4b/MTS2 gene is differentially implicated among non-Hodgkin's lymphomas. *Nature*, **1998**;12(6):937-941.
74. **Harper DR.** Molecular Virology: A Medical Perspectives Book, 1<sup>st</sup>. Ed., UK: BIOS Scientific Publishers Limited, **1994**.
75. **Durmaz R.** Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, **2001**.
76. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Book 2, 2<sup>nd</sup>. Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.
77. **Serin M.S.** Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR). Aslan G, Emekdaş G, Köksal F, Serin M.S. *IV. Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu: Uygulamalı Moleküler Kurs Kitabı*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 51, Mersin, **2005**;37-52.

78. **Temizkan G, Arda N.** Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapları, **1999**;19-68.
79. **Taylor G.R.** Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In: McPherson M.J, Quirke P, Taylor G.R. *PCR Volume 1: A Practical Approach*, 1<sup>st</sup>. Ed., New York: Oxford University Press, **1991**;1–14.
80. **Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ.** PCR Protocols. Academic Pres, Inc., 1<sup>st</sup>. Ed., California: **1990**;3-12.
81. **Akar N.** Klinik Moleküler Patolojiye Giriş. 1. Baskı, Ankara; A.Ü. Tıp Fakültesi Bilimsel Yayınlar Sersi, **2000**;95-135.
82. **Klug WS, Cummings MR.** Genetik Kavramlar. Editör:Öner C. Altıncı Baskıdan Çeviri. Palme Yayıncılık, **2002**;449-531.
83. <http://genetics.nbii.gov/portal/server.pt>
84. <http://www.cbs.dtu.dk/staff/dave/roanoke/genetics980211.html#5.8%20PCR>
85. **McPherson MJ, Moller SG.** PCR: The Basics from Background to Bench, 1<sup>st</sup>. Ed., UK: BIOS Scientific Publishers Limited, **2000**.
86. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Book 1, 2<sup>nd</sup>. Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.
87. **Poncz M, Solowiejczyk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S.** Construction of human gene library from small amounts of peripheral blood. Analysis of  $\beta$ -like globin genes. Hemoglobin, **1982**;6(1):27-36.
88. **Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB.** Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **1996**;93(18):9821-9826.
89. **Takahashi T, Shivapurkar N, Reddy J, Shigematsu H, Miyajima K, Suzuki M, Toyooka S, Zochbauer-Muller S, Drach J, Parikh G, Zheng Y, Feng Z, Kroft SH, Timmons C, McKenna RW, Gazdar AF.** DNA Methylation Profiles of Lymphoid and Hematopoietic Malignancies. *Clinical Cancer Research*, **2004**;10(9):2928–2935.
90. **Chim CS, Liang R, Tam CY, Kwong YL.** Methylation of p15 and p16 Genes in Acute Promyelocytic Leukaemia: Potential Diagnostic and Prognostic Significance. *J Clin Oncol*, **2001**;19(7):2033-2040.
91. **Chim CS, Liang R, Kwong YL.** Hypermethylation of Gene Promoters in Hematological Neoplasia. *Hematol Oncol*, **2002**;20(4):167–176.

92. **Baur AS, Shaw P, Burri N, Delacretaz F, Bomsan FT, Chaubert P.** Frequent Methylation Silencing of p15INK4b (MTS2) and p16INK4a (MTS1) in B-Cell and T-Cell Lymphomas. *The American Society of Hematology*, **1999**;94(5):1773-1781.
93. **Wang JC, Chen W, Nallusamy S, Chen C, Novetsky AD.** Hypermethylation of the P15INK4b and P16INK4a in agnogenic myeloid metaplasia (AMM) and AMM in leukaemic transformation. *British Journal of Haematology*, **2002**;116(3):582–586.
94. **Garcia MJ, Martinez-Delgado B, Cebrian A, Martinez A, Benitez J, Rivas C.** Different Incidence and Pattern of p15INK4b and p16INK4a Promoter Region Hypermethylation in Hodgkin's and CD30-Positive Non-Hodgkin's Lymphomas. *American Journal of Pathology*, **2002**;161(3):1007-1013.
95. **Kumagai T, Tefferi A, Jones L, Koeffler HP.** Methylation analysis of the cell cycle control genes in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leukemia Research*, **2005**;29(5):511–515
96. **Hofmann WK, Tsukasaki K, Takeuchi N, Takeuchi S, Koeffler HP.** Methylation analysis of cell cycle control genes in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leuk. Lymphoma*, **2001**;42(5):1107-1109.
97. **Garcia-Manero G, Daniel J, Smith TL, Kornblau SM, Lee MS, Kantarjian HM, Issa JPI.** DNA Methylation of Multiple Promoter-associated CpG Islands in Adult Acute Lymphocytic Leukemia. *Clinical Cancer Research*, **2002**;8(7):2217-2224.

## ÖZGEÇMİŞ

1 Temmuz 1981 tarihinde Niğde'de doğdu. İlk ve ortaöğrenimi Niğde'de, liseyi Adana'da tamamladı. 1999-2003 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimini tamamladı. 2003 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü Biyokimya Programı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2004 yılında araştırma görevlisi kadrosuna atandı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Eczacılık Bilimleri Biyokimya Programı'nda yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.