



**PROSTAT KANSERİYLE İLİŞKİLENDİRİLMİŞ TÜMÖR
BASKILAYICI GENLERİN MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT
PROBE AMPLIFICATION (MLPA) YÖNTEMİ İLE METİLASYON
PATERNLERİNİN BELİRLENMESİ**

Esin ÖZCAN

**Kasım, 2013
DENİZLİ**

**PROSTAT KANSERİYLE İLİŞKİLENDİRİLMİŞ TÜMÖR
BASKILAYICI GENLERİN MULTIPLEX LIGATION-
DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) YÖNTEMİ İLE
METİLASYON PATERNLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

Esin ÖZCAN

Danışman: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

İkinci Danışman: Doç. Dr. Emre TEPELİ

**Kasım, 2013
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Esin ÖZCAN tarafından Prof. Dr. Gülseren BAĞCI yönetiminde hazırlanan “**Prostat Kanseriyle İlişkilendirilmiş Tümör Baskılayıcı Genlerin Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemi İle Metilasyon Paternlerinin Belirlenmesi**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
Jüri Başkanı (Danışman)

Doç. Dr. Emre TEPELİ
Jüri Üyesi (İkinci Danışman)

Doç. Dr. Vildan CANER
Jüri Üyesi

Doç. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ
Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Ozan ÇETİN
Jüri Üyesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..../..../..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zekiye Melek BOR KÜÇÜKATAY
Müdür

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca ve tez çalışmam süresince bana her türlü desteği veren değerli tez danışman hocam Prof. Dr. Gülseren BAĞCI'ya teşekkür ederim. Ayrıca Yüksek Lisans öğrenimim boyunca ve tez çalışmam sırasında bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım Doç. Dr. Vildan CANER ve Doç. Dr. Emre Tepeli'ye, ayrıca Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Nilay ŞEN TÜRK'e, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Ömer Levent TUNCAY ve Yrd. Doç. Dr. Ali Ersin ZÜMRÜTBAŞ'a, emeği geçen bütün hocalarıma ve arkadaşlarıma, özellikle sonsuz desteklerinden dolayı arkadaşım Levent ELMAS'a ve tüm manevi desteğinden dolayı eşi Zühal ELMAS'a tez projemi destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne çok teşekkür ederim.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :
Öğrenci Adı Soyadı : Esin ÖZCAN

ÖZET

PROSTAT KANSERİ İLE İLİŞKİLENDİRİLMİŞ TÜMÖR BASKILAYICI GENLERİN MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) YÖNTEMİ İLE METİLASYON PATERNLERİNİN BELİRLENMESİ

Özcan Esin

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

Kasım 2013, 95 sayfa

Prostat kanseri 65 yaş üzeri erkekler arasında en yaygın görülen kanserdir. Prostat kanseri multifaktöriyel bir hastalıktır. Yaş, aile hikayesi ve gen mutasyonları kanserin risk faktörleridir.

Kanser, gelişiminde ve ilerlemesinde epigenetik mekanizmalar önemlidir. CpG adalarının hipermetilasyonu transkripsiyonal sessizleşmede ve tümör baskılayıcı genlerin düzenlenmesinde kritik rol oynar. Spesifik tümör baskılayıcı genlerin promotörlerinin DNA metilasyonu en çok çalışılan epigenetik mekanizmadır.

Çalışmada, Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) yöntemi kullanılarak prostat kanserleriyle daha önce ilişkilendirilmiş 25 ayrı tümör baskılayıcı genin promotör bölgelerinin metilasyon paternlerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada prostat kanser tanısı alan 76 olgu değerlendirildi. DNA metilasyon analizi formalinle fikse edilmiş parafine gömülü mesane doku örneklerinde gerçekleştirildi. DNA izolasyonunu takiben, MS-MLPA yöntemi ile 25 ayrı tümör baskılayıcı genin promotör bölgelerinin metilasyon paternleri SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probemix kiti kullanılarak analiz edildi.

Çalışmada, prostat doku örneklerinin % 81,6'i metile, % 18,4'i unmetile olarak belirlenmiştir. Metillenmiş genler arasında en yüksek metilasyon oranı *MSH6*, *RARβ*, ve *GSTP1* genlerinde tespit edildi. Bu üç genin metilasyon durumları ile klinikopatolojik parametreler karşılaştırıldığında *RARβ* için aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Sonuç olarak, MS-MLPA yönteminin prostat kanserinin metilasyon profillerinin taramasında kullanılabilecek, ucuz ve hızlı sonuç verebilen bir teknik olduğu görülmektedir. MS-MLPA yöntemi diğer metilasyon tarama yöntemleriyle karşılaştırılırsa daha hassas ve duyarlıdır. *RARβ* erken tanısında rutin kullanıma geçirilmesinde daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Prostat kanseri, Tümör baskılayıcı genler, Metilasyon, MS-MLPA

ABSTRACT**Determination of Methylation Patterns of Tumor Suppressor Genes Associated with Prostate Cancer by Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) method.**

Özcan, Esin

M. Sc. Thesis in Department of Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

November 2013, 95 pages

The prostate cancer is most common site of cancer among men older 65years. Prostate cancer is a multifactorial disease. Age, family history and mutations of genes are risk factors for cancer.

Epigenetic mechanisms in cancer are important for cancer development and progression. Hypermethylation of CpG islands plays a critical role in transcriptional silencing and the regulation of tumor suppressor genes. DNA methylation of promoters of specific tumor suppressor genes most studied epigenetic mechanism.

In this study, it was aimed to analyze methylation pattern of 25 tumor suppressor genes in promoter regions associated with prostate cancer using Methylation specific-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) technique.

76 patients with prostate cancer were analysed in this study. The analysis of DNA methylation was performed on formalin fixed paraffin embedded prostate tissues samples. After DNA isolation, methylation patterns of 25 different tumor suppressor genes promoter regions with MS-MLPA technique were analyzed using SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probemix kit.

In the study, methylated 81,6% of bladder tissue samples, unmethylated 18,4%. Among the methylated genes were identified the highest rate of methylation in *MSH6*, *RARβ* and *GSTP1* genes. Methylation of these three genes status and clinicopathological parameters were compared, statistically significant differences was found to *RARβ*

As a result, it was determined that MS-MLPA is a technique which can give cheap, fast and reliable results in screening methylation pattern of prostate cancer. MS-MLPA method is more accurate and sensitive compared with other methods of methylation screening. Realising routinely used in the early diagnosis of prostate cancer emphasized the need for more extensive research.

Key Words: Prostate cancer, Tumor suppressor genes, Methylation, MS-MLPA.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
İçindekiler	
Şekiller Dizini	
Tablolar Dizini	
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	5
2.1. Kanser	5
2.1.1. Kanser Epidemiyolojisi	6
2.1.2. Kanser Türleri	10
2.1.3. Kanser Gelişimi	13
2.1.4. Kanser ve Genetik	15
2.2. Prostat Kanseri	17
2.2.1. Prostat Kanseri Etiyolojisi	17
2.2.2. Prostat Kanseri Epidemiyolojisi	19
2.2.3. Prostat Kanserinde Epigenetik Mekanizmalar	21
2.2.4. Prostat Kanserinin Tipleri ve Histopatolojik Sınıflandırılması.....	27
2.3. Metilasyon-spesifik MLPA (MS-MLPA).....	32
3. MATERYAL VE METOD	36
3.1. Materyallerin Toplanması	36
3.2. Formalinle Fiske Edilmiş Parafine Gömülü Prostat Dokularından Genomik DNA İzolasyonu	36
3.2.1. DNA İzolasyon Protokolü	37
3.3. İzole Edilen Genomik DNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının ve Saflık Değerlerinin Belirlenmesi.....	40
3.4. İzole Edilen DNA Örneklerinin MS-MLPA Yöntemiyle Analizi	40
3.4.1. DNA Denaturasyonu ve SALSA MS-MLPA ME002-B1 Tumor Suppressor probe mix hibridizasyonu.....	41
3.4.2. Ligasyon ve enzim kesim reaksiyonu.....	41

.....3.4.3.Amplifikasyon(PCR).....	43
.....3.4.4.Beckman Coulter CEQTM8000 Genetik Analiz Sistem Cihazına Yükleme.....	44
.....3.4.5. Değerlendirme.....	44
3.5. İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR	46
4.1. DNA Örneklerinin Konsantrasyonları ve Saflık Değerleri	46
4.2. Klinikopatolojik Parametreler	49
4.3. Metilasyon Profili	51
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ	77
7. KAYNAKLAR	81
8. ÖZGEÇMİŞ	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsani Gelişme Endeksine (İGE) göre veriler.....	7
Şekil 2.2. Türkiye’de 2004 yılında görülen ilk 10 kanser türü.....	8
Şekil 2.3. Türkiye’de erkeklerde görülen ilk 10 kanser türü.....	8
Şekil 2.4. Türkiye 2006 yılı kadın ve erkeklerde görülen kanser türleri ve oranları.....	9
Şekil 2.5. Sağlıklı dokudan, kanser oluşumuna kadar meydana gelen mikroskobik değişiklikler.....	12
Şekil 2.6. Kanser gelişim süreci.....	14
Şekil 2.7. DNA metilasyonunun kanserdeki yeri.....	16
Şekil 2.8. Türkiye’de erkeklerde en sık görülen kanser türleri.....	21
Şekil 2.9. Epigenetik mekanizmalar: DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu.....	24
Şekil 2.10. DNA metilasyonu, sitozine metil transferi ve histon modifikasyonları.....	25
Şekil 2.11. Histon proteinleri ve DNA bileşeni ile oluşan oktomer yapısı.....	26
Şekil 2.12. Kromotin yeniden modellenmesi.....	27
Şekil 2.13 MS-MLPA reaksiyonunun aşamaları.....	34
Şekil 4.1. Patolojik evreye göre alt grupların yüzdeler dağılımı.....	51
Şekil 4.2: Prostat kanserli 76 hastanın klinikopatolojik dağılımları.....	52
Şekil 4.3. Normal metilasyon profiline bir hastanın prostat kanser dokusuna ait enzim kesimi yapılmış MLPA görüntüsü (61 nolu hasta örneği).....	55
Şekil 4.4. Prostat kanser dokusunda <i>CDH13</i> , <i>WT1</i> , <i>GSTP1</i> , <i>ESR1</i> , <i>MSH6</i> , <i>RARβ</i> geninde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü (63 nolu hasta).....	55

Şekil 4.5. Prostat kanser dokusunda <i>RARβ</i> , <i>CD44</i> geninde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü (49 nolu hasta).....	56
Şekil 4.6. Prostat kanser dokusunda <i>TP73</i> , <i>RBI</i> , <i>MSH6</i> genlerinde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü (51 nolu hasta).....	56
Şekil 4.7. Normal prostat dokusu (51 nolu örnek).....	57
Şekil 4.8. Normal prostat dokusu (55 nolu hasta).....	57

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Türkiye’de 2006 yılında erkeklerde sık görülen kanser türlerinin insidans hızları:.....	10
Tablo 2.2. DSÖ’nün prostat tümörleri (2004) histolojik sınıflandırma.....	28
Tablo 2.3 Gleason Derecelendirmesi.....	31
Tablo 2.4 SALSAS MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probemix içinde mevcut olan kontrol problemleri ve incelenecek genlere ait problemlerinin listesi	35
Tablo 3.1 DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit) içeriği.....	38
Tablo 3.2. Prob mix’in içeriği.....	42
Tablo 3.3. Ligaz 65 mix içeriği.....	43
Tablo 3.4. Ligaz-65 mix enzimli içerik.....	43
Tablo 4.1 DNA örneklerinin konsantrasyon değerleri ve saflık değerleri.....	47
Tablo 4.2 Prostat kanser tanısı almış 76 hastanın klinikopatolojik özellikleri.....	50
Tablo 4.3 Prostat kanser tanısı almış 76 hastada kullanılan MS-MLPA ME002-B1 prob setinde yer alan genlerin açılımı ve belirlenen metilasyon yüzdeleri.....	53
Tablo 4.4 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda <i>MSH6</i> metilasyon profili.....	58
Tablo 4.5 <i>MSH6</i> geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi.....	58
Tablo 4.6 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda <i>RARβ</i> metilasyon profili.....	60
Tablo 4.7 <i>RARβ</i> geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi.....	60
Tablo 4.8 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda <i>GSTP1</i> metilasyon profili.....	62
Tablo 4.9 <i>GSTP1</i> geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi.....	62
Tablo 4.10 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda <i>CDH13</i> metilasyon profili.....	64
Tablo 4.11 <i>CDH13</i> geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi.....	64
Tablo 4.12 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda <i>TP73</i> metilasyon profili.....	66
Tablo 4.13 <i>TP73</i> geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi.....	66
Tablo 4.14 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda <i>CD44</i> metilasyon profili.....	68
Tablo 4.15. <i>CD44</i> geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi.....	68
Tablo 4.16 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda <i>ESR1</i> metilasyon profili.....	70
Tablo 4.17 <i>ESR1</i> geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi.....	70
Tablo 4.18 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda <i>WT1</i> metilasyon profili.....	72
Tablo 4.19 <i>WT1</i> geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi.....	72
Tablo 4.20 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda <i>RBI</i> metilasyon profili.....	74
Tablo 4.21. <i>RBI</i> geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi.....	74

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

APC	Adenomatöz polipozis koli
ATM	Ataksi telanjiektazi mutasyonu
BRCA1	Meme kanseri 1
BRCA2	Meme kanseri 2
CpG adası	Sitozin-fosfat-guanin bölgeleri; DNA dizisinde sitozinin hemen ardından guaninin yer aldığı bölgeler
CD44	Kaderin 44
CDH1	Kaderin 1 (E-kaderin)
CDH13	Kaderin 13 (H-kaderin)
CHFR	Checkpoint with forkhead and ring finger domains
COX2	Siklooksijenaz 2; PTGS2 (prostaglandin endoperoksid sentaz)
DNMT	DNA metiltransferaz
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ESR1	Östrojen reseptörü 1
FFPE	Formalinle fikse edilmiş parafine gömülü doku
FHIT	Frajil histidin triad proteini
GSTP1	Glutatyon S-transferaz P 1
MGMT	O6- metilguanin DNA metiltransferaz
MLPA	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
MSH6	Mut S homolog 6
MS-MLPA	Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
MSP	Metilasyon-spesifik polimeraz zincir reaksiyonu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
PYCARD	Apoptoz ile ilişkili leke benzeri protein (ASC)
RAR β	Retinoik asit reseptörü β
RASSF1A	Ras ilişkili domain aile üyesi 1 A
RB1	Retinoblastoma 1
TERT	Telomeraz ters transkriptaz
THBS1	Thrombospondin 1
TIG1	Tazaroten kaynaklı 1; RARRES1 (Retinoik asit reseptörüne cevap 1)
TNM	Tümör-Nod-Metastaz
TP53	Tümör proteini p53
TP73	Tümör proteini p73
TSG	Tümör baskılayıcı gen
WT1	. Wilms tümörü 1

1. GİRİŞ

Kanser, çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler sonucunda onkogenlerin aktif ve tümör baskılayıcı genlerin inaktif hale gelmesi ile şekillenen kompleks bir hastalıktır. (Jemal vd 2011) Ürogenital kanserlerden biri olan prostat kanseri %14'lük bir oranla erkeklerde en sık görülen kanserler sıralamasında ikinci sırada yer alırken; yine kansere bağlı ölüm nedenleri arasında %6'lık bir oranla altıncı sırada yer almaktadır (Jemal vd 2011). Lokalize prostat kanserinde 5 yıllık sağ kalım % 100 iken, metastatik durumda 5 yıllık sağ kalım % 34 düzeyindedir ve prostat kanseri (PCa) saptanan tüm hastalarda yaşam sonuna kadar metastaz gelişmemektedir. Bu durum prostat kanserine yaklaşımı diğer kanser tiplerinden farklı bir pozisyona sokmaktadır (Jeronimo vd 2001).

Prostat kanseri dünyada erkeklerde en sık görülen dördüncü kanser olup, buna bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra en sık ikinci kanser tipidir (Jeronimo vd 2001). Tüm dünyada yılda 650.000'den fazla erkeğe PCa tanısı konulmaktadır (Ferlay 2006, Ann Oncol 2007). Bunun yanında prostat kanseri, Türkiye'de de 2005 yılında yapılan istatistiklere göre erkeklerde 100.000'de 24,33 insidans ile kanserler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Prostat kanserinin insidansı ve mortalitesi ırksal ve etnik gruplar arasında ve ülkeden ülkeye farklılıklar gösterebilmektedir (Jeronimo vd 2001).

Prostat kanserinin başlangıcına ve ilerlemesine yol açan nedenler henüz tam olarak bilinmemekle beraber, genetik ve çevresel faktörlerin hastalığın gelişiminde önemli rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır (Jemal vd 2011). Yine diyetle yüksek yağlı diyetle beslenenlerde prostat kanseri görülme sıklığının arttığı ve antioksidan içeriği yüksek besinlerle beslenen toplumlarda da prostat kanseri görülme sıklığının düşük olduğu görülmüştür (Jemal vd 2011). Genetik faktörlerden mutasyon ve polimorfizmler DNA'da kalıcı nükleotid değişiklikleri içerirken, epigenetik değişimler DNA'da kalıcı gen ekspresyon değişikliklerini ifade eder (Wilson vd 2003). Prostat kanserinin erken teşhisi

günümüzde yaygın olarak fiziksel muayene ve serum prostat spesifik antijenin (PSA) belirlenmesi ile sağlanmaktadır. Ancak, parametrelerin sınırlı duyarlılık ve özgüllükleri nedeniyle bu parametrelerin prostat kanserinde güvenilirliği hala tartışma konusudur (Yegnasubramanian vd 2004). Bunların yanı sıra genetik mutasyonlar ve epigenetik değişikliklerin de önemi vurgulanmıştır (Jeronimo vd 2002). Son yıllarda yapılan çalışmalar, epigenetik değişikliklerin tümör gelişiminde oldukça önemli olduklarını göstermiştir. Kanser gelişimi süresince meydana gelen en önemli epigenetik değişiklikler arasında tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen DNA metilasyonu ve kromatin yapısındaki histon modifikasyonlar bulunmaktadır (Mompalmer 2003, Plass 2002). DNA metilasyonu için hipo- veya hipermetilasyon, histon modifikasyonları için asetilasyon veya deasetilasyon epigenetik değişikliklere örnek olarak verilebilir.

Prostat kanserinde promoter bölge hipermetilasyonu birçok insan tümöründe karsinogenezin erken evre bulgusudur ve sıklıkla prostat kanserinin erken aşamalarında, yani daha büyük bir tümör kitlesi oluşmadan, metaplazi ve displazi aşamalarında saptanabilir. Memeli genomunu oluşturan genlerin promoter bölgelerinde CpG adaları normalde metillenmemiş halde bulunmaktayken, tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgelerinin hipermetilasyonu tümörlerde en fazla gözlenen epigenetik değişikliklerdendir. Bu nedenle, metilasyona bağlı olarak bu genlerin transkripsiyonel susturulması kanser gelişimi ile ilişkilidir.

Prostat kanserinde epigenetik mekanizma ile susturulmuş olan genlerin belirlenmeleri prostat kanseri tanısında yararlı oldukları için her biri ayrı iyi bir moleküler belirteç sayılmaktadırlar. Ayrıca, hastalık ilerledikçe ve yüksek dereceli prostatik intraepitelyal neoplazi (HGPI) evresi arttıkça, metilasyon sıklığının da giderek arttığı gözlenmiştir (Jeronimo vd 2001, Jones ve Takai 2001, Bird vd 1985).

Metilasyon, memeli genomunda yalnızca CpG dinükleotidlerinde guanozine göre 5' lokalizasyon gösteren sitozin bazlarında meydana gelir (Strathdee ve Brown 2002). Sitozin bazının 5. karbonuna metil grubu (-CH₃) eklenmesiyle, 5-metilsitozin (5-meC) oluşur (Jones ve Takai 2001). Genomda tüm sitozinlerin %3-4'ü metile halde bulunmaktadır. Transkripsiyon faktörleri metile olan bu bölgelere bağlanamadıklarından, DNA metilasyonu doğrudan mRNA transkripsiyonunun baskılanmasına neden olur.

DNA metilasyonu gen ifadesinin baskılanması, genom güvenliği ve yapısal bütünlüğünün korunmasında işlev görür. 5-meC'deki metil grubu DNA replikasyonunu etkilemez, fakat DNA'nın büyük oluşuna çıkıntı yaptığından dolayı protein-DNA etkileşmesini etkiler (Jones ve Takai 2001, Robertson ve Wolffe 2000). Bu nedenle, omurgalı genomundaki metilasyon transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek, bu yolla transkripsiyonun susturulmasına yol açar. Metilasyona bağlı kanser gelişimi genom genelinde hipometilasyon, CpG adalarındaki hipermetilasyon nedeniyle tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu ve CpG dinükleotitlerindeki mutasyonlar olmak üzere üç farklı mekanizma ile açıklanabilir.

CpG dinükleotitlerince zengin ve 0.5 – 4 kilobaz uzunluğundaki DNA bölgeleri CpG adaları olarak tanımlanır (Strathdee ve Brown , 2002, Jones ve Takai 2001). Buna karşılık, genom genelinde dağınık halde bulunan CpG'lerin % 70'i metiledir. CpG adaları özellikle dokularda devamlı ifade edilen bazı genlerin promoter bölgeleri ve ilk ekzonlarında bulunurlar (Strathdee ve Brown 2002, Bird 2002). CpG adaları memeli genomunu oluşturan genlerin promoter bölgelerinde metillenmemiş halde bulunurlar; buna karşılık, promoter bölgelerin hipermetilasyonu tümörlerde en fazla gözlenen epigenetik değişikliklerdendir. Bu nedenle, metilasyona bağlı olarak promoter bölgenin transkripsiyonel susturulması kanser gelişimi ile ilişkilidir (Jones ve Baylin 2002).

Yapılan birçok çalışmada, eşey hücreleriyle kalıtılan ilk mutasyonun ardından ikinci allelin susturulmasındaki en önemli mekanizmalardan birinin metilasyon olduğu görülmüştür. Yani, mutasyonlu allelin promoter bölgesinde herhangi bir değişiklik meydana gelmezken; sağlam allelde metilasyon sonucu inaktivasyon meydana gelmiştir. Promoter bölge hipermetilasyonuna bağlı olarak susturulan ve böylece kansere neden olan aday tümör baskılayıcı genlerin listesi gün geçtikçe artmaktadır.

Bu çalışmada, prostat kanseri hastalarında, MLPA tekniğini kullanarak tümör baskılayıcı genlerin metilasyonlarını belirlemeyi ve bunun kanser ile ilişkisini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla Pamukkale Üniversitesi Patoloji Bölümü'nde prostat tanısı konmuş olan 80 olguya ait parafin bloklara gömülü doku örneklerinden DNA izolasyonu ve MLPA yöntemi kullanılarak da bu örneklerin metilasyon paternleri belirlendi. Çalışmadan elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Ayrıca ülkemizde MLPA tekniği kullanılarak prostat kanseri metilasyonu hakkında yapılan çalışma olmamasından dolayı, yaptığımız bu çalışmayla literatüre katkı sağlamanın, hastalığın belirlenmesi ve erken tanıya olanak sağlaması açısından katkıda bulunması amaçlandı.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

Bu bölüm “ Kanser, prostat kanseri, DNA metilasyonu, tümör baskılayıcı genler ve bunların incelenmesine olanak sağlayan MLPA yöntemi olmak üzere 5 ana başlık ve her bölümün alt başlıklarını içermektedir.

2.1. Kanser

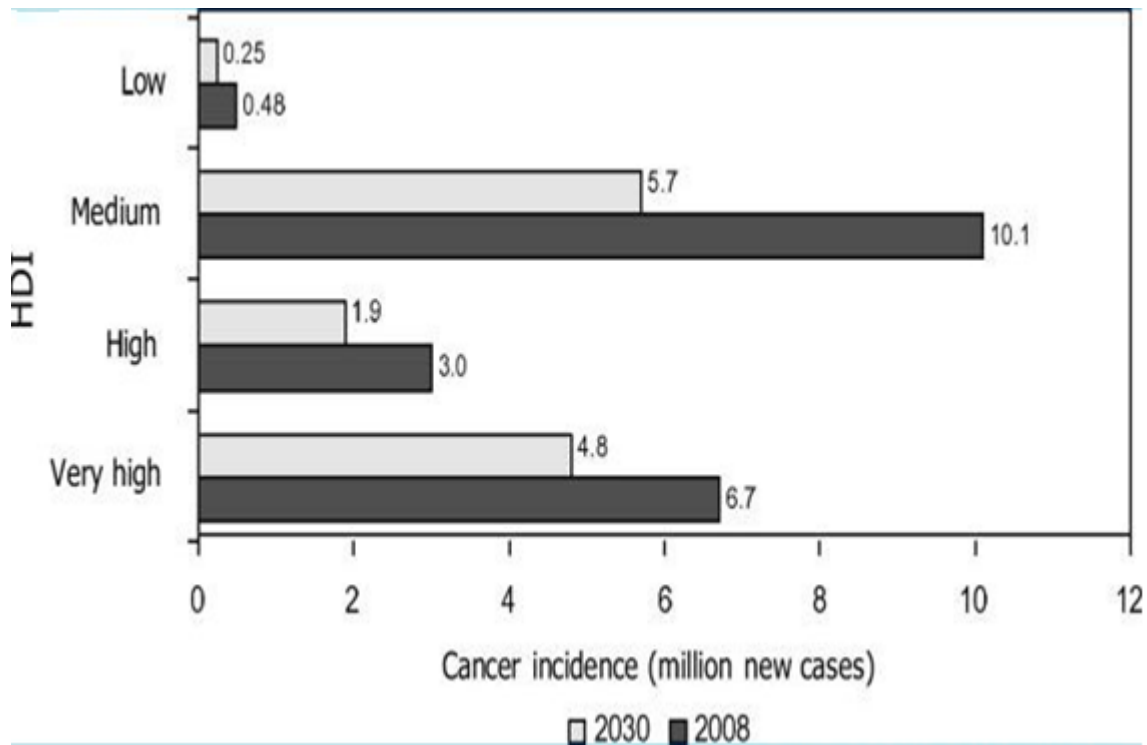
Kanser, hücrenin standart metabolizmasının ve mekanizmasının bozulması sonucu ortaya çıkan, çok basamaktan oluşan kompleks bir hastalıktır. Normal hücre metabolizmasında hücre bölünmesi olayı organizmanın gereksinimini karşılamak üzere gerçekleştirildiği halde, kanserli hücrelerde bu gereksinim söz konusu olmadan da hücre bölünme ve çoğalma eğilimindedir. Yani hücrede kontrol mekanizması saf dışı kalmış, sonuç olarak; kontrolsüz hücre çoğalmaları ve farklılaşmaları gerçekleşmektedir. Bu da bütün organizmaya yayılabilecek boyutlarda sonuçlar ortaya çıkarmaktadır.

Kanser oluşumunun birçok sebebi olmasına rağmen hala bilinmeyen yönleri ve etkenleri de bulunmaktadır. Buna yönelik çok sayıda çalışma yapılması da konunun önemini gösterir niteliktedir. Bizim çalışmamızda da olduğu gibi kanser konulu araştırmaların büyük çoğunluğunda; sebepler belirlenerek önlem alma, kalıcı tedavi yöntemleri geliştirebilme amaçlanmaktadır.

Kanser hücrenin temel mekanizmalarındaki değişikliklerden kaynaklandığından dolayı bu hastalığa sebep olan değişiklikleri moleküler boyutta incelemek daha doğru olacaktır.

2.1.1. Kanser Epidemiyolojisi

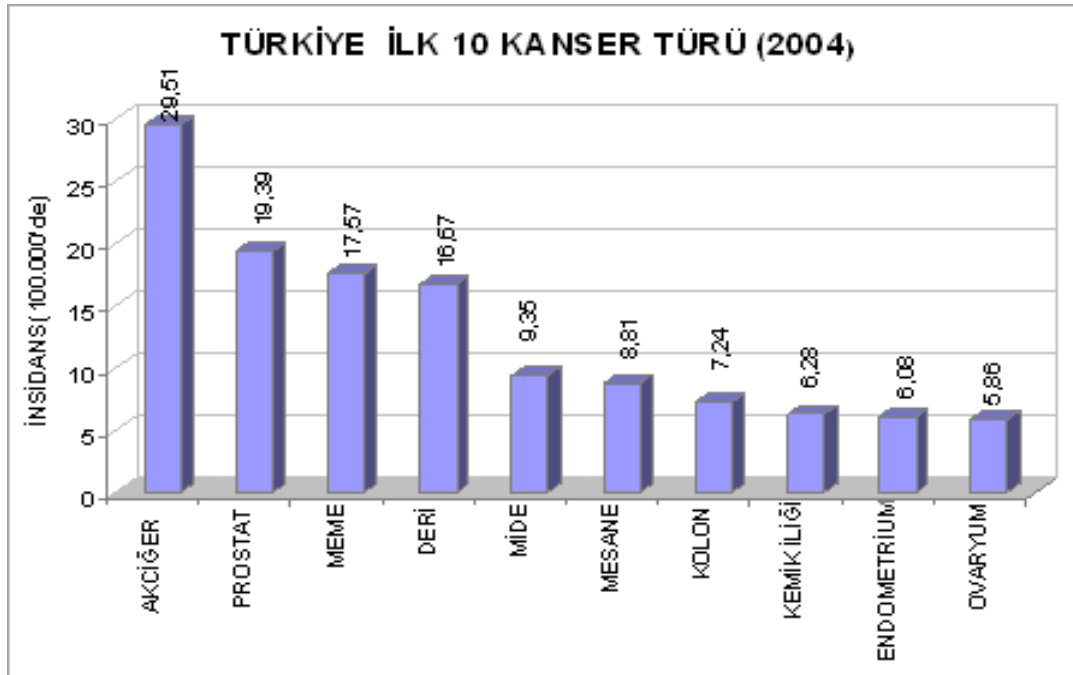
Kanser, tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra en yaygın görülen ikinci hastalıktır. Uluslar Arası Kanser Araştırmaları Kurumu (IARC) 2008 yılında 12,4 milyon yeni kanser vakası, 7,6 milyon kanser nedeni ölüm ve 28 milyon; ilk tanıdan bu yana 5 yıl ya da daha az süre geçmiş kanserli hasta olduğunu tahmin etmektedir. IARC ayrıca yeni vakaların yarısından biraz fazlasının ve kanser nedeni ölümlerin üçte ikisinin düşük ve orta gelir grubundaki ülkelerde olduğunu tahmin etmiştir. 2008’de dünya nüfusu tahmini 6,7 milyar olup bunun 2030’da 8,3 milyara yükselmesi beklenmektedir (Dünya nüfus öngörülere: 2006 revizyonu). Bu dönemde yüksek gelir grubundaki ülkelerin nüfusları %4 artarken düşük ve orta gelir grubundaki ülkelerde bu artışın yaklaşık %38 olarak gerçekleşmesi beklenmektedir. Ayrıca düşük ve orta gelir grubundaki ülkelerde 65 yaş ve üzerindeki nüfusun oranının da %5,3 ile %9,8 arasında, gelişmiş ülkelerde ise %14,6 ile %22,6 artış göstermesi beklenmektedir. Kanseri oranlarıyla yaş arasındaki güçlü bağlantı göz önünde bulundurulduğunda 2030 yılında en çok düşük ve orta gelir grubundaki ülkelere etki edecek artan bir kanser yükünden söz edilebilir.



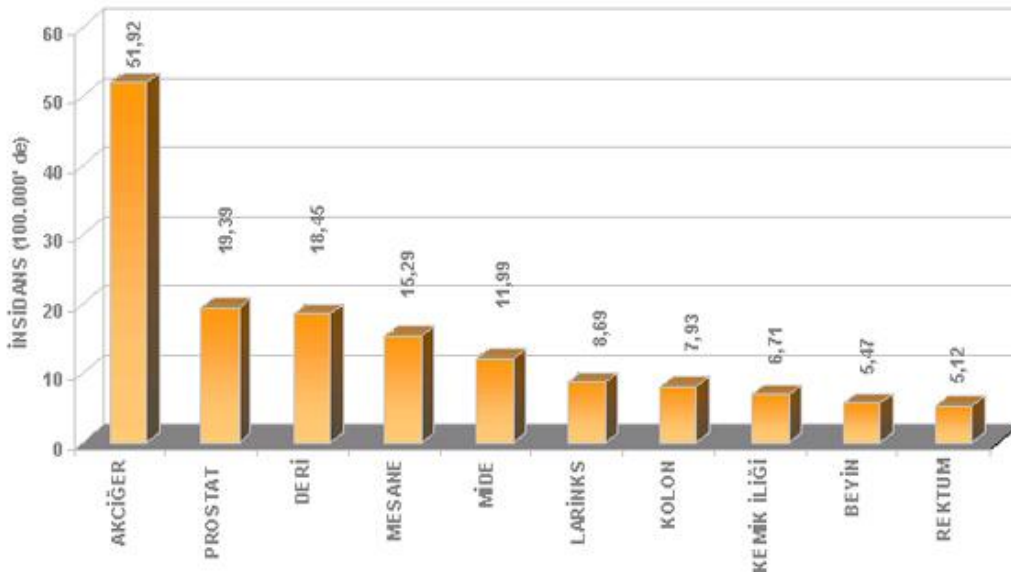
Şekil 2.1. İnsani Gelişme Endeksine (İGE) göre veriler. kanser yüküne uyarlanmıştır. Kişi başına düşen gayri safi milli gelir ile ölçülen ve yaşam standartlarının, okullaşma yıllara

göre ölçülen eğitim; doğumda yaşam beklentisi ile ölçülen sağlık,: HDI üç boyuttan oluşmaktadır (Web 1, 2012)

Türkiye’de, erkeklerde kansere bağlı ölümlerin en büyük kısmını (%42) akciğer ve larinks kanserleri oluşturmaktadır. KC ve böbrek ilk on kanser içinde görülmediği halde ölüm nedenleri içinde 7.ve 9.sırada yer almaktadır. Beyin tümörü ise insidansı 10. sırada olmasına karşın ölüm nedenlerinde ilk onda yer almamaktadır. Kadınlarda olduğu gibi beyin tümörü ölümlerinin %10 civarında olabileceği düşünülebilir. Farinks ve oral kavite kanserleri de ölümlerde 10. sırada görülürken, insidansta ilk onda değildir. Mortalite ile ilgili sonuçlarda genellikle kanser bildirimlerinin diğer tanılara göre daha doğru olduğu birçok çalışmada saptanmıştır, fakat kanser türleri açısından, ölüm nedenlerinin insidans ve sağkalm verileriyle çok uyumlu olmadığı gözlenmektedir.



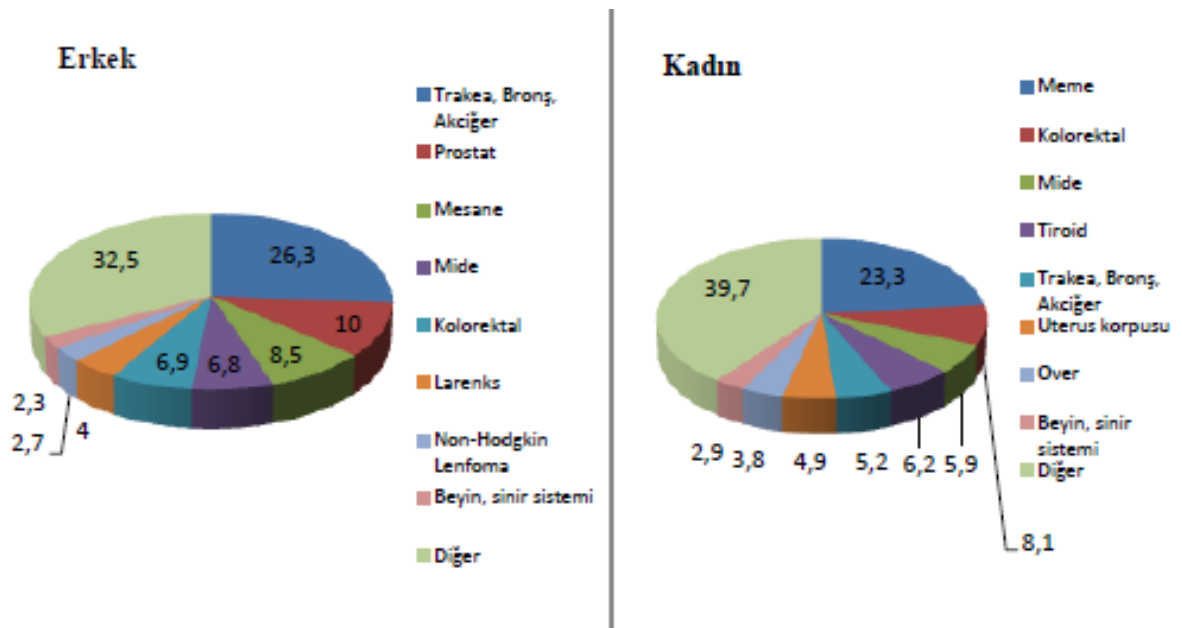
Şekil 2.2. Türkiye’de 2004 yılında görülen ilk 10 kanser türü (Sağlık Bakanlığı Kanseler Savaş Daire Başkanlığı) (Web 2, 2004)



Şekil 2.3.: Türkiye’de erkeklerde görülen ilk 10 kanser türü (Web 3, 2004)

2010 yılında ise ülkemizdeki aktif yöntemle veri toplayan, yeterli tamlık ve geçerliliğe ulaştığı saptanan sekiz nüfus tabanlı kanser kayıt merkezinin 2006 yılı verilerine dayanarak yapılan bir çalışma, Türkiye’de kanser görülüşüne ilişkin doğru bilgiler sunmaktadır. Bu çalışmada, İzmir, Antalya, Bursa, Eskişehir, Samsun, Trabzon, Edirne ve Erzurum kanser kayıt merkezlerinin 2006 yılı kayıtları temel alınarak Türkiye geneli için bir insidans tahmini yapılmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre ülkemizde her yıl erkeklerde 91000, kadınlarda 61000 olmak üzere toplam 152000 yeni kanser olgusu ortaya çıkmaktadır. Erkek ve kadınlarda en sık görülen kanserler Şekil 2.4’de

sunulmuştur.



Şekil 2.4. Türkiye 2006 yılı kadın ve erkeklerde görülen kanser türleri ve oranları (İzmir, Antalya, Bursa, Eskişehir, Samsun, Trabzon, Edirne ve Erzurum illeri baz alınmıştır) (Web 4)

Ülkemizde erkeklerde en sık görülen kanser türü akciğer kanseri olup, tüm kanserlerin %26'sını oluşturmaktadır. Akciğer kanserinden sonra ikinci sırada prostat kanseri(% 10) bulunmakta, bunu mesane (% 8,5), kolorektal (% 6,9) ve mide kanserleri (%6,8) izlemektedir.

Kadınlarda ise meme kanseri ilk sırada yer alır iken (%23,3), kolorektal (%8,1), tiroid (%6,2), mide (%5,9) ve akciğer (%5,2) kanserleri yaygın görülen diğer kanser türleridir.

Tablo 2.1 .Erkeklerde ve kadınlarda en sık görülen kanserlerin olgu sayısı, rölatif frekansı ve insidans hızları , Türkiye 2004-2006 (Web 5)

Tablo 3: Erkeklerde en sık görülen kanserlerin olgu sayısı, rölatif frekansı ve insidans hızları, (Türkiye, 2004-2006)

Yerleşim Yeri	Olgu Sayısı ¹	Rölatif Frekans (%)	Kaba Hız ²	YSH ³
Trakea, Bronş, Akciğer	11177	27,0	66,3	66,7
Prostat	4522	10,9	26,8	27,5
Mesane	3390	8,2	20,1	20,3
Kolorektal	2888	7,0	17,1	17
Mide	2460	5,9	14,6	14,6
Larinks	1596	3,9	9,5	9,5
Non-Hodgkin lenfoma	1082	2,6	6,4	6,4
Beyin, sinir sistemi	901	2,2	5,3	5,3
Böbrek	761	1,8	4,5	4,6
Pankreas	767	1,9	4,5	4,5
Tüm kanserler	41438	100,0	245,6	246,5
Deri hariç⁴ tüm kanserler	37545	90,6	222,6	223,2

¹Verihavuzundaki olgu sayısı, ²Yüz binde, ³Yüz binde, Dünya Standart Nüfusu, ⁴M.Melonom dışında

Tablo 4: Kadınlarda en sık görülen kanserlerin olgu sayısı, rölatif frekansı ve insidans hızları, (Türkiye, 2004-2006)

Yerleşim Yeri	Olgu Sayısı ¹	Rölatif Frekans (%)	Kaba Hız ²	YSH ³
Meme	6597	23,8	39,1	35,8
Kolorektal	2186	7,9	13	11,7
Tiroid	1744	6,3	10,3	9,3
Uterus Korpusu	1373	5,0	8,1	7,7
Trakea,Bronş,Akciğer	1380	5,0	8,2	7,5
Mide	1318	4,8	7,8	7
Over	1054	3,8	6,3	5,8
Uterus Serviksi	844	3,0	5	4,6
Non-Hodgkin lenfoma	824	3,0	4,9	4,5
Beyin, sinir sistemi	714	2,6	4,2	4,1
Tüm kanserler	27709	100,0	164,4	150,3
Deri hariç⁴ tüm kanserler	24502	88,4	145,4	133,3

2.1.2. Kanser Türleri

Kanser çoğu kez tek bir hastalık gibi görünse de, aslında hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalık grubudur. Mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi tüm kanser

türlerinin ortak özelliği olarak kabul edilmektedir. Genomik değişiklikler genel olarak kanserle ilişkilidir. Örneğin; tek nükleotit değişimi gibi küçük ölçekli veya kromozom kaybı yada kazanımı, viral genomun hücre genomuna katılımı, kromozomun yeniden düzenlenmesi gibi büyük ölçekli değişiklikler kanserin genel karakteristiği içindedirler. Bunun yanı sıra yeni dönemde epigenetik değişimlerin de kanser oluşumunda rol oynadığı dikkat çekmektedir.

Kanser patolojisinde en önemli nokta benign ve malign tümör farkının ortaya konabilmesidir. Hücrelerin anormal çoğalması sonucunda ortaya çıkan tümör selim (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olabilmektedir. Selim tümörler çevredeki doku veya vücudun herhangi bir bölgesine yayılım göstermeyen, yalnız olduğu bölgeyle sınırlı kalmış ve bu nedenle “iyi huylu” olarak da bilinen türdür. Bunun aksine çevredeki dokuya veya çeşitli yollar izleyerek diğer doku ve organlara yayılım gösterebilen (yani metastaz yapabilen) tümörlere de malign yani “kötü huylu” da denebilmektedir. Benign tümörler genel olarak köken aldıkları hücre tipinin sonuna –oma eki getirilerek isimlendirilirler Gerek malign, gerekse benign tümörler türedikleri hücreye göre sınıflandırılır. (Cooper ve Hausman 2006).

Karsinom; yaşam boyu bölünme yeteneğine sahip epitel hücrelerden (ektoderm, mezoderm ve endoderm) köken alan ve insan kanserlerinin %90’ını oluşturan tümörlerdir.

- İnsanlardaki tüm kanserlerin %3’ünü oluşturan; **Sarkomlar;** kas, kemik, kıkırdak ve fibröz bağ dokularının solid tümörleridir.

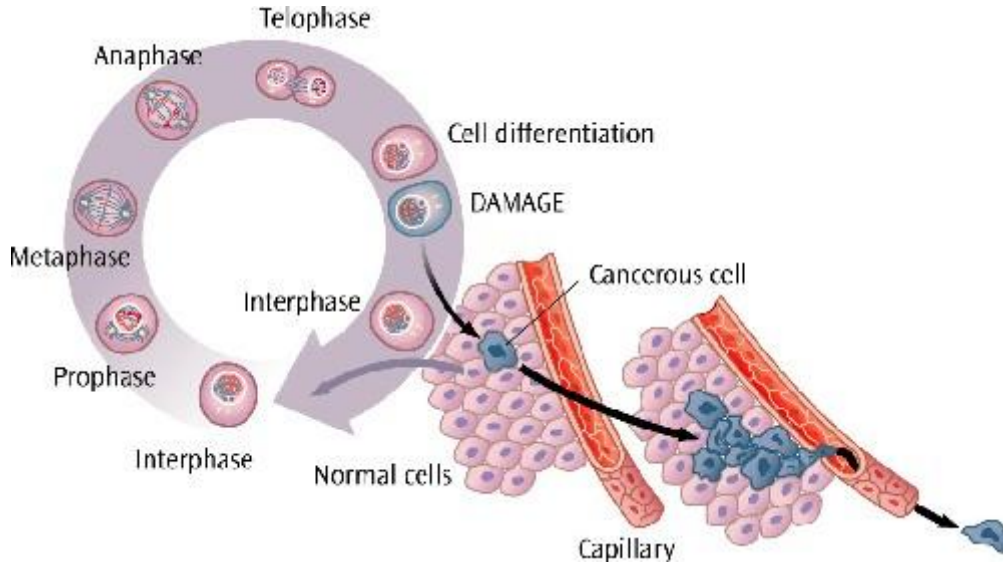
- Kan ve immün sistem hücrelerinden gelişen ve tüm kanserlerin %7’sini oluşturan diğer malign tümör sınıfı; **Lösemilerdir** (Lüleyap 2008).

Benign ve malign neoplazmları farklı parametrelere göre değerlendirdiğimizde aşağıdaki gibi farklılıkları olduğu görülmektedir.

Benign ve malign neoplazmların özellikleri;

Benign ve malign tümörlerin ayırt edilebileceği belirli farklar:

1. **Diferansiasyon ve anaplazi:** Benign tümörler köken aldıkları (oluştukları) dokulara göre tipiktir. Malign tümörler ise oluştukları dokulara göre atipiktir. Diferansiasyonda kayıp vardır.
2. **Büyüme hızı:** Benign tümörler genellikle yavaş bir şekilde büyür. Hatta bazı dönemlerde durabilir veya gerileyebilirler. Mitoz seyrek veya normaldir. Malign tümörlerde ise büyüme hızı değişken olabilmekte, mitoz da çok sayıda ve anormal olabilmektedir.
3. **Lokal invazyon:** Benign tümörler, genellikle yapışık ve iticidir. İyi sınırlı kitle, çevre dokulara invaze ve infiltre etmez. Malign tümörler ise, lokal olarak invazivdirler. Çevre normal dokuları infiltre eder, bazen yapışık ve itici görülebilirler.
4. **Metastaz:** Benign tümörlerde yoktur, fakat malign tümörlerde sıklıkla görülür. Daha büyük ve daha az diferansiye primer tümör daha sık metastaz yapar (Nussbaum vd 2005). (Kumar vd 2000)



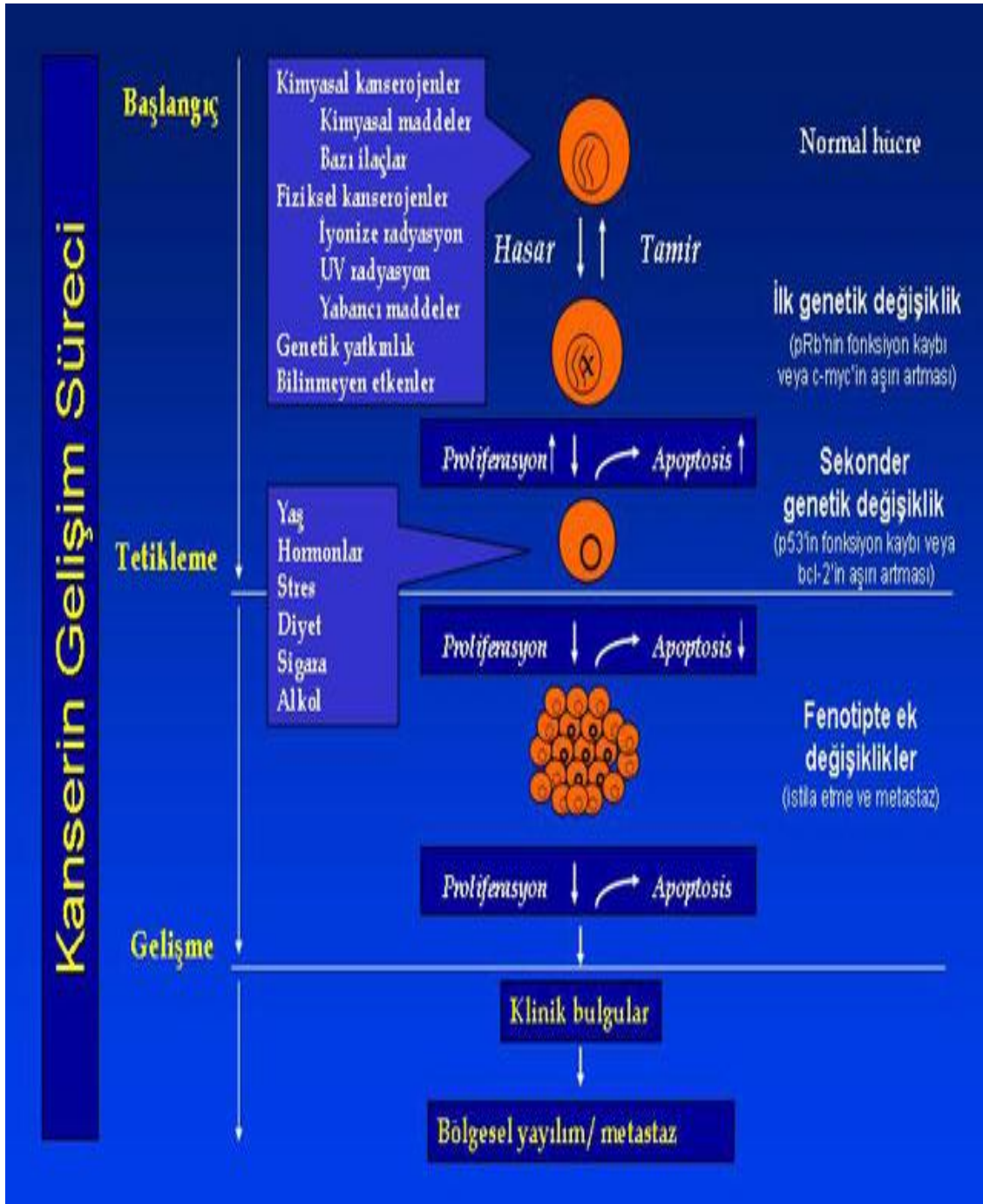
Şekil 2.5. Sağlıklı dokudan, kanser oluşumuna kadar meydana gelen mikroskobik değişiklikler (WEB 6)

2.1.3. Kanser Gelişimi

Kanser, basit bir ifadeyle kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilir. Kontrolsüz çoğalmayla birlikte kanser hücrelerinin bölünebilme için herhangi bir uyarana gereksinim duymaması, hücrelerde kontak inhibisyonun ortadan kalkması, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme gibi özellikleri de kanser hücresinin karakteristik özelliklerindedir.

Kanser, insan genlerini hedef alarak herhangi bir proteinin aşırı üretimi, gereksinimden daha az üretimi veya yapısal ve işlevsel olarak farklı (bozuk) halinin üretimine sebep olabilmektedir. Genlerin işlevini kaybetmesi, kimi zaman tümör baskılayıcı genlerde olduğu gibi hücrenin anormal şekilde çoğalmasına sebep olurken, kimi zaman da çok farklı etkilerle ortaya çıkabilmektedir.

Çoğu kanser sadece tek bir hücreden (ya da az sayıda hücreden) doğar (Brabletz vd 2005). Bu hücre kanserli olmak için onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde hücrenin normal sınırının çok ötesinde çoğalmasını sağlayacak birkaç değişiklik geçirmelidir. Bu süreç “asi” hücrelerden oluşan bir klonun oluşumuna yol açar. Eğer organizma bu klonu tolere eder ve rahatsız edilmeden kalırsa, çoğalmaya devam edebilir ve bu süreç içinde içerdiği hücreler gittikçe artan sayıda modifikasyon biriktirir. Böylesi bozulmuş bir süreçte, sadece en uygun ve en saldırgan hücreler hayatta kalacak ve daha örgütsüz olan hücrelerin yerini alacaktır. Tümörler bu şekilde malign hale gelirler. Bu aynı zamanda kanserin tedavisinin bu denli zor olmasının da nedenidir: hastalara kanser hücrelerini etkin olarak öldüren bir ilaç verildiğinde, hayatta kalan az sayıdaki hücre, kendilerini ilaca karşı dirençli kılan değişiklikler geçirmiş olanlardır (Brabletz vd 2005).



Şekil 2.6. Kanser gelişim süreci (web 7)

2.1.4. Kanser ve Genetik

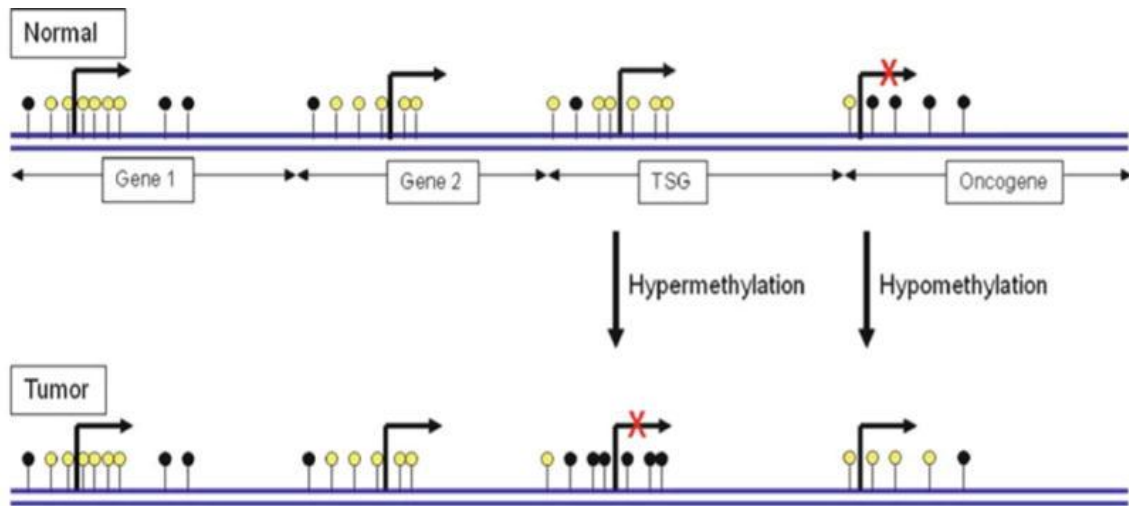
Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi olarak tanımlandığı için hücre bölünmesinde rol oynayan protein ve enzimlerde oluşacak değişiklikler de kansere alt yapı oluşturmaktadır.

Bu süreçte etkili genler:

1. Onkogenler
2. Tümör supressor (baskılayıcı) genler

olmak üzere 2 alt sınıfta toplanabilir. Bu genlerde meydana gelecek genetik ve epigenetik herhangi bir değişiklik hücre bölünmesini de etkileyeceği için kanser oluşum sürecinde önemli rol oynar.

Tümör baskılayıcı genlerin kodladığı proteinler, protoonkogen ve onkogen proteinlerinin aksine, hücrenin çoğalmasını ve sağ kalımını baskılar. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile negatif düzenleyici olarak görev yapan bu proteinleri ortadan kaldırılması tümör oluşumunu sağlar. Tümör baskılayıcı proteinler, çoğunlukla onkogenler ile uyarılan aynı sinyal yollarını baskılar (Cooper ve Hausman 2006). Birçok tümörde bu genlerin hasar görmesi veya inaktive olması nedeniyle hücre çoğalmasını negatif yönde düzenleyen etki ortadan kalkar ve tümör hücreleri çoğalma olanağı bulmuş olur. Tümör baskılayıcı genler genel olarak hücre döngüsünün devamı için diğer basamağa geçip ilerleyişini durdurarak işlev görmektedir. Hücre bölünmesi için bu genlerin inaktif olması yada etkisinin ortadan kalkması gerekmektedir. Ancak bu genlerin etkisi devamlı olarak ortadan kalkacak olursa hücre bölünmesinin kontrolü de ortadan kalkmış olacaktır.



Şekil 2.7. DNA metilasyonunun kanserdeki yeri: metillenmemiş ve metillenmiş CpG bölgesi beyaz ve siyah dairelerle gösterilmiştir. Bu figür normal ve tümör genomik DNA'sını temsil etmektedir. Gen 1 ve gen 2'nin promotor bölgesi ve tümör baskılayıcı gen normal hücrede çok nadir metile olur ve bu nedenle normalde eksprese edilebilir. CpG adasındaki promotor bölgedeki tümör baskılayıcı gen metile olması gen susturulmasıyla sonuçlanır. Aksine promotor bölgesi hipometilasyonu onkogenin reaktif olmasına yol açmaktadır.

Şekil 2.7.'de verilen bilgi genel olarak prostat kanserinde de geçerlidir. RASSF1A, protoonkogenlerden olan RAS ailesi hücresel proliferasyonunda anahtar rol oynayan bir protoonkogenidir. Hücre büyüme ve ölüm sürecinde düzenleyicidir. RAS'ın fazla ekspresyonu büyüme faktörlerini artırır ve apoptozise dirençlidir. Bunun yanında RAS domain family protein 1 isoform ile ilişkili, bir tümör baskılayıcı gendir. DNA tamir proteini ve apoptotik etkisiyle bilinmektedir (Kuzmin vd. 2002). RASSF1A'nın metilasyon ile inaktivasyonu DNA tamir mekanizması ve hücre siklusunu deregüle eder. Promotor bölgede RASSF1A'nın metilasyonuna prostat kanserini de içeren çeşitli kanser türlerinde rastlanmaktadır (Liu Lvd 2002). Prostat tümörleri arasında RASSF1A promotor hipermetilasyonu %21- %91 arasında değişen bir oranla görülmektedir (Jerónimo vd 2004, Maruyama vd 2002, Hogue vd 2005, Florl AR vd 2004, Rouprêt vd 2007, Okegawa vd 2010, Aitchison vd 2007).

RASSF1A promotor hipermetilasyonu prostat kanserinin metastazı ile pozitif korelasyon göstermektedir (29,92,93). Aitchison ve arkadaşlarının normal epitelyal hücrelerde ve benign prostatik dokularda %50 oranında metile olduğunu raporlamışlardır. Bu bulgular da RASSF1A'nın promotor metilasyonunun erken karsinogenez süreci ile ilgili olduğunu gösterir niteliktedir.

GSTP1, yaklaşık 4 kb uzunluğunda, 7 ekzon ve 6 intron içermektedir (Morrow vd 1989, Cowell vd 1988) ve 715 baz mRNA kodlamaktadır. GSTP1'in promotoru 1.5 kilobazlık CpG adası içerisinde ekzon 1-3 arasındadır. Yaklaşık 150bp'lik bir bölgedir. Transkripsiyon bölgesini içine alır. Transkripsiyonu negatif regülasyon ile baskılanabilmektedir.

2.2. Prostat Kanseri

PCa günümüzde sıklığı giderek artan, tanı ve tedavisindeki yeniliklerle birlikte lokalize olarak yakalandığında tam olarak kür sağlanabilecek bir hastalıktır. Hastalığa yaklaşımla ilgili gelişmelere rağmen özellikle 50 yaş üzerindeki erkeklerde hasta sağlığını ciddi şekilde tehdit eder. Çoğunlukla biyolojik davranışı düşük olup yavaş ilerleyen bir hastalık olduğundan geç semptom verir. Tümörün ikiye katlanma zamanı 4 yıl civarındadır. PCa'de klinik davranış spektrumunun çok farklı olması sonucu, her hastanın kişisel olarak tedavi edilebileceği birçok seçenek vardır.

2.2.1. Prostat Kanserinin Etiyolojisi

Prostat kanser etilolojisi bir muamma olarak kalmaya devam etmektedir. (Boyle vd 2003). Bir IARC monografi çalışma grubu tütün kullanımıyla prostat kanseri arasında hiçbir ilişki bulamamıştır. Prostat kanseri ile alkol kullanımının hiçbir ilişkisi bulunamazken birçok faktör kanser ihtimalini artırmaktadır. Ailede prostat kanseri (baba, erkek kardeş) bulunması, Afro - Amerikan kökenli olma, hava kirliliği, yüksek yağlı diyet bu ihtimali artıran sebepler arasındadır (IARC 2004).

Makro besinlerin alımıyla prostat kanseri riski arasında küçük bir ilişki olduğu anlaşılmaktadır. Besinsel yağ ve etin prostat kanseri açısından potansiyel risk faktörleri

olması birçok epidemiyolojik araştırmanın odak noktası olmuş ve özellikle yakın dönemde yapılan çalışmaların bulguları tutarlılık arz etmemiştir. Çok etnisiteye sahip yapılan bir çalışmada farklı yağ türlerinin (doymuş, tekli doymamış veya çoklu doymamış) n-6 yağ asidinin , kolesterolün, çeşitli etlerin ve etlerden elde edilen yağların alınmasının prostat kanser riskiyle bir ilişkisi bulunmadığı ortaya koyulmuştur. 4 farklı etnik grup (Afrika kökenli Amerikalılar, Japon kökenli Amerikalılar, Latin kökenliler ve beyazlar) üzerinde yapılan çalışmada yağ ve et alımıyla prostat kanseri arasında bir ilişkiye işaret eden çok az kanıt ulaşılabilmektedir. Etnik olarak farklı popülasyonlarda yapılan bu çalışmada elde edilen bilgilerin tamamı yağ tüketiminin prostat kanser riskini önemli ölçüde etkilediğine dair bir işaret vermemektedir (Park vd 2007). Çalışmalarda karışık sonuçlara ulaşılmış olsa da omega-3 yağ asitleri kanser riskinin azalmasına yardımcı olmaktadır. İleriye yönelik epidemiyolojik çalışmaları içeren 38 makaleden yapılan bir meta-analiz çalışması, omega-3 yağ asitleri alımıyla kanser riski ilişkisini incelemiştir. Bununla ilgili de herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır. (MacLean vd 2006).

Risk faktörlerini belli başlıklar altında toplayacak olursak,

- Yaş
- Ailede prostat kanseri varlığı
- Yağlı beslenme
- Hormonlar
- Kadmium
- A ve D Vitaminleri

Prostat kanserinin risk faktörleri açısından ele aldığımızda;

Yaş: Prostat kanserinin en önemli risk faktörüdür. 45 yaş altında nadir görülür.

Yaşlandıkça risk artar. ABD’de 65 yaş ve üzerinde görülmektedir.

Aile öyküsü: Erkek kardeşinde prostat kanseri olanlarda risk artar.

İrk: Afrikalı Amerikalılarda beyazlardan daha yaygındır.

Prostat kanserinde etnik gruplar arasında belirgin farklılıkların olması genetik faktörlerin önemli olduğunu vurgulamaktadır. Zamanla elde edilen etnik gruplar arasındaki değişik oranlardan, genetik nedenlere eşlik eden diğer faktörlerin olduğu da bulunmuştur. Bunlar çevre ve yaşam tarzı faktörleridir. Geniş araştırmalara rağmen, prostat kanserindeki çevresel risk faktörleri iyi anlaşılmamıştır. Ekolojik, vaka-kontrol, kohort çalışmalarından anlaşılan; prostat kanseri etyolojisine diyetle alınan yağın önemli olduğudur. Hayvansal

ürünlerin özellikle kırmızı etin tüketimi ile ilgili güçlü pozitif ilişki vardır. Bu çalışmalardan anlaşılan prostat kanserinde meyve ve sebzelerin koruyucu etkisi olduğudur. Amerika'da yapılan bir çalışmada, muhtemel diyet ve hayat tarzı risk faktörlerinin dağılımındaki farklılıklar prostat kanseri için yüksek riski açıklayamamıştır. Bu yüzden genetik faktörler; ırklar arasında gözlemlenen farklılıkları açıklayan esas faktörlerdir. Bunu destekleyen ise; aile hikayesi olanlarda bu riskin artmış olmasıdır (Beşer 2006).

2.2.2. Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi

Prostat kanseri, erkeklerde en sık ölüm nedeni olan kanserler arasında 2. Sıradadır (Rosai ve Ackerman 2004).

Dünya çapında 1990 yıllardan itibaren insidansı yükselmeye başlamıştır (14). Prostat için uygulanan tedavi metodlarının gelişmesi, özellikle transüretal prostat rezeksiyonu (TUR-P) operasyonunun yaygın kullanıma girmesi ile birlikte batılı ülkelerde 1970'lerin sonu, 1980'lerin başında insidansında yükselme olmuştur (Potolsky vd 1990). 1986–1992 yılları arasında PSA'nın kullanıma girmesi ile birlikte PCa yakalama insidansında belirgin bir artış olmuştur PSA klinik evre ve histolojik grade olarak kabul görmektedir (Potolsky vd 1995). 1990'ların ortalarında ABD'de insidansında minimal bir azalma görülmesine rağmen tekrar yükselmeye başlamıştır. Asya ülkelerinde görülme insidansı genel olarak düşüktür, ancak son yıllarda artmaya başlamıştır. Bunun sebebi olarak da batılı tip yaşam tarzının, özellikle diyet ve beslenme alışkanlığının giderek yaygınlaşması gösterilmiştir (Hsing , Devesa 2000).

Yaşlanma ile birlikte erkeklerin çoğunda mikroskopik prostat kanser odağı yaşadıkları popülasyondaki yüksek veya düşük risk durumuna göre invaziv hastalık ortaya çıkmaktadır (CHİGUSA vd 1982). Erkeklerin çoğunda mikroskopik hastalık gelişmesine rağmen, bunlardan çok küçük bir oranı invaziv hastalık haline gelmekte ve çok az bir kısımda erken ölümlere neden olmaktadır.

PCa, kansere bağlı ölümlerde akciğer ve kolon kanserinden sonra 3. Sıradadır ve kansere bağlı ölümlerin %9'undan sorumludur (JEMAL vd 2006). PCa görülme insidansı yaşla birlikte artmaktadır. 39 yaşındaki bir erkekte prostat kanseri oluşma olasılığı yaklaşık

olarak 1/10000 iken, bu oran 40–59 yaş aralığında 1/103, 60–79 yaş aralığında 1/8 olmaktadır (Wingo vd 1995).

Klinik PCa batı toplumlarında sık görülür. Dünyada PCa insidans hızının en yüksek olduğu nüfus grubu, ABD’de yaşayan zencilerdir. Bu grupta prostat kanserinin insidans hızı yüz binde 137 olarak hesaplanmıştır; ABD’de yaşayan beyazlarda ise aynı rakam 101 olarak kaydedilmiştir. Hastalığa Asya ülkesinde nadir rastlanır (Parkin vd 1997).

Çoğu ülkede toplumsal bir halk sağlığı problemi olarak görülen prostat kanserinden ortalama ölüm yaşı 80’dir. İngiltere ve Hollanda’da yapılan çalışmalarda prostat kanserinin ortalama tanı yaşı, meme ve kolon kanserinden daha fazladır.

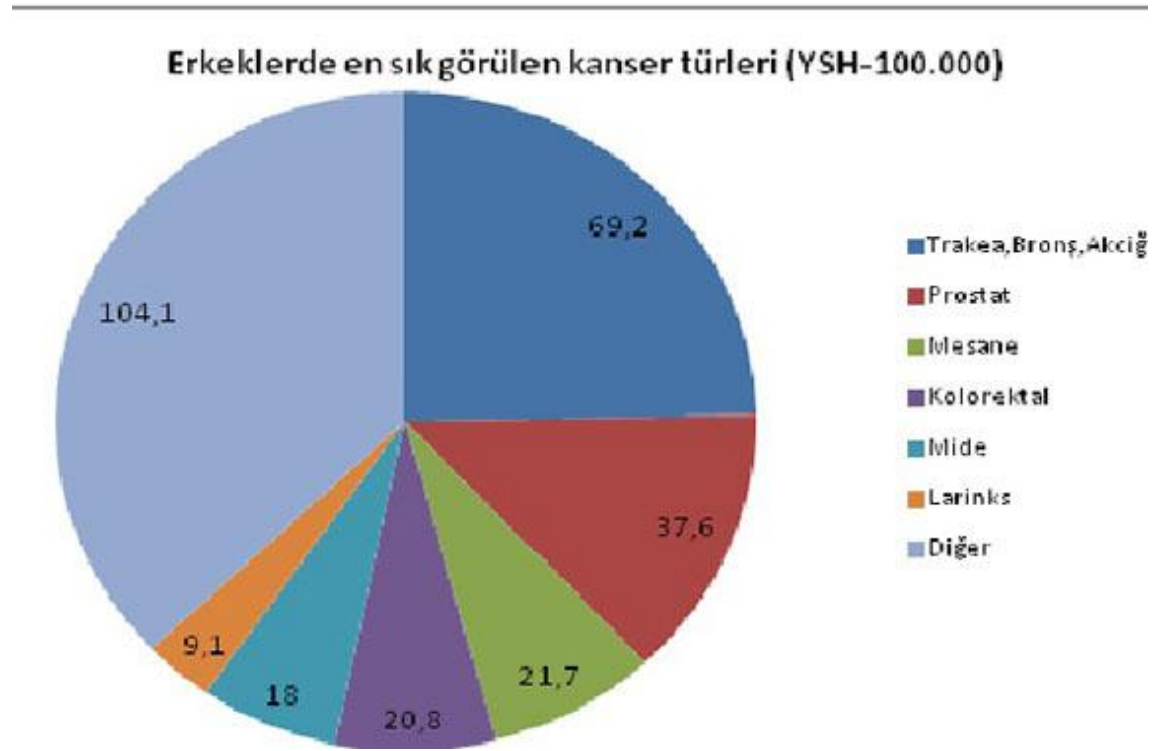
Ülkemizde PCa insidansı konusunda kesin rakamlar yoktur. Fakat Fidaner ve arkadaşlarının 1993–94 yılları arasında İzmir’de yaptıkları çalışmada prostat kanserinin İzmir’deki insidans hızı yüzbinde 9,1 olarak belirtilmiştir. Bu oran Doğu Avrupa ülkeleri seviyesindedir ancak Amerika Birleşik Devletlerinin 12’de biridir (Fidaner, vd. 2001).

Yaşam boyu mikroskobik PCa gelişme riski %30 civarındadır. Bu kanserlerin birçoğu yavaş büyüme eğilimindedir ve klinik hastalık oluşturma oranı %10’dur. Böylece yaşam boyu prostat kanserinden ölme riski %3’tür. Son yıllarda klinik öneme sahip PCa insidansında önemli artışlar yaşanmaktadır. Bununla beraber dünyadaki insan popülasyonu gittikçe yaşlanan bir toplum haline gelmektedir (Grayhack ve Kozlowski, 1991).

Yaşlanan toplumların bir sonucu olarak prostat kanseri insidansının yıllar içinde artacağı öngörülebilir. Dünyada, erkeklerde ilk üç sıra kanser türü, prostat, akciğer ve kolon iken, Türkiye’de bu sıralama akciğer, prostat ve mesane şeklinde olmaktadır. Erkeklerde akciğer kanseri insidansı Türkiye’de yüz binde yaklaşık 69’larda olup dünya ortalaması ise yüz binde 30-35’lerde, Avrupa Birliği ortalaması ise 100.000’de 48’ler dedir. Şekil 2.8.’de ise Türkiye’de erkekler arasında en çok görülen kanser türleri gösterilmektedir.

Prostat kanseri için, dünya ortalaması yüz binde 28’lerde iken, Avrupa ortalaması yüz binde 60’larda ve ülkemizde ise yüz binde 37’ leredir.

Prostat kanserinin sebepleri kesin olarak bilinmemektedir. Bulaşıcı değildir, insandan insana geçmez. Araştırmalar prostat kanseri gelişme riskini artıran bazı faktörler olduğunu göstermiştir.



Şekil 2.8. Türkiye’de erkeklerde en sık görülen kanser türleri (Web_8)

2.2.3. Prostat Kanserinde Epigenetik Mekanizmalar

1942 yılında Conrad Waddington tarafından ilk kez epigenetiğin tanımı yapılmıştır (Kosova vd 2011). Epigenetik, DNA dizisindeki değişimlerle açıklanamayan, mayoz veya mitoz bölünme ile aktarılabilen, gen fonksiyonundaki değişiklikler olarak tanımlanmaktadır (Erol vd 2010, Hamilton 2011, Kosova vd 2011). Epigenetik değişiklikler, nükleozom konumunu değiştirerek tüm kromatin yapısı üzerinde doğrudan etki eden düzenlemelerdir. 4 ana grupta toplanmaktadır:

1. DNA metilasyonu,
2. Histon modifikasyonları,
3. RNA ile indüklenen sessizleşme (Kodlanmayan RNA’lar)
4. Kromatin yeniden düzenlenmesi

Bu mekanizmaların ortak çalışması sonucu genetik değişimler meydana gelmektedir (2).

Bu mekanizmalardan DNA metilasyonu kanserde en yaygın olarak karşımıza çıkmaktadır. (Agundez vd 2011). Kanser genetik ve epigenetik hataların birikimi olarak ortaya çıktığı bir durum olduğundan epigenetik hata ve farklılıklar kanser açısından da önem arz etmektedir. Çünkü DNA ile ilgili değişimler kanser ile ilgili genlerin yapısal olarak değişimine de sebep olmaktadır. DNA hipometilasyonları onkogenleri aktive ederken, hipermetilasyonu ise tümör baskılayıcı genlerin susturulması ve dolayısıyla işlevini yerine getirememesine yol açmaktadır.

Epigenetik mekanizmalar doğrudan ve dolaylı olmak üzere 2 şekilde gen ifadesini kontrol etmektedir. Dolaylı yoldan gen ifadesinin kontrolünü post-transkripsiyonel olarak miRNA ve siRNA gibi kodlamayan RNA'lar ile mRNA'yı etkileyip protein sentezini engelleyerek yapmaktadır. Doğrudan gen ifadesi kontrolünü ise kromatin modifikasyonları ve DNA düzeyindeki modifikasyonlar olmak üzere 2 farklı yolla yapmaktadır.

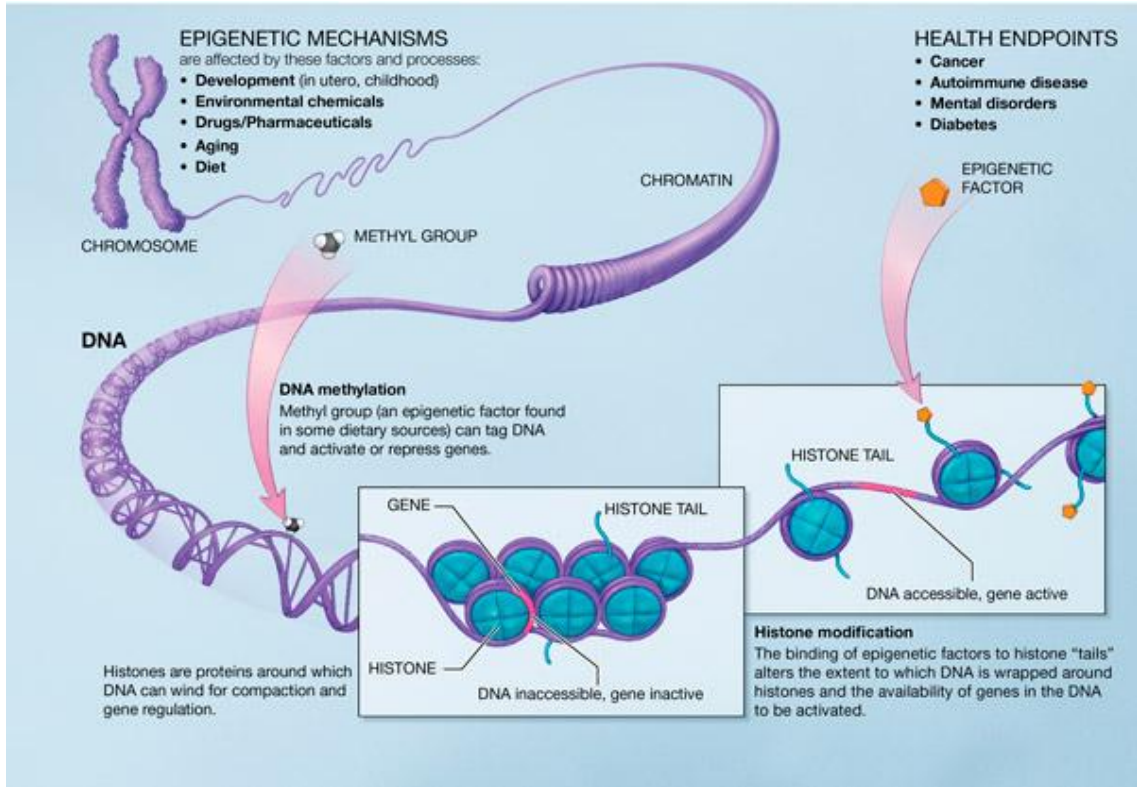
İnsan linear kromozomal DNA yaklaşık 2 m'dir ve hücreler içinde paketlenmek zorundadır. Bu noktadaki çözüm, kromatindir ve kromatin yapılanmasında özelleşmiş DNA paketleme proteinleri (başlıca histonlar), histon toplanması veya uzaklaştırılmasında görev alan faktörler ve kromatini yeniden düzenleyen kompleksler (remodeler'lar) görev alır. Remodeler'lar nükleozomların hareket etmesi, uzaklaştırılması ve yeniden yapılanması gibi kromatinin paketlenme durumlarını değiştirebilmek için ATP hidrolizinden çıkan enerjiyi kullanırlar. Remodeler'lar paketlenmeyi ve paketin açılmasını kontrol etmek için diğer kromatin faktörleri ile birlikte çalışırlar, çünkü kromozomal işlemleri kontrol eden DNA elementleri (enhancer'lar, promoter'lar, replikasyon orijinleri) gen transkripsiyonu, DNA replikasyonu, DNA tamiri ve DNA rekombinasyonu gibi farklı mekanizmaların gerçekleşmesi için düzenlenmelidirler. Dolayısıyla, kromatin yapısı sadece paketlenme için bir çözüm değildir, aynı zamanda regülasyon için de önemli bir fırsattır (Cedric vd 2009).

Yukarıda da bahsedildiği gibi birçok önemli hüresel olayın gerçekleşebilmesi için kromatin dinamik bir yapıdadır. Kromatin yapılanması regüle eden mekanizmalardan biri de histon modifikasyonlarıdır ve günümüzde en sık çalışılan histon modifikasyonları, kor histonların fleksible N-terminal kuyruklarında gerçekleşen modifikasyonlardır. Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikütinasyon, sumolasyon,

ADP ribozilasyon, deiminasyon ve prolin izomerizasyon olmak üzere en az 8 farklı tip histon modifikasyonlarının varlığı bilinmektedir. Histon modifikasyonları, nükleozomun yapısına yeni bir grubun eklenmesi, histon yükünün değişmesi veya özgün proteinlerin ilgili bölgeye toplanmasını sağlayarak, farklı hücresel yanıtların oluşmasına neden olabilirler (Izzo ve Schneider ,2011).

DNA metilasyonu

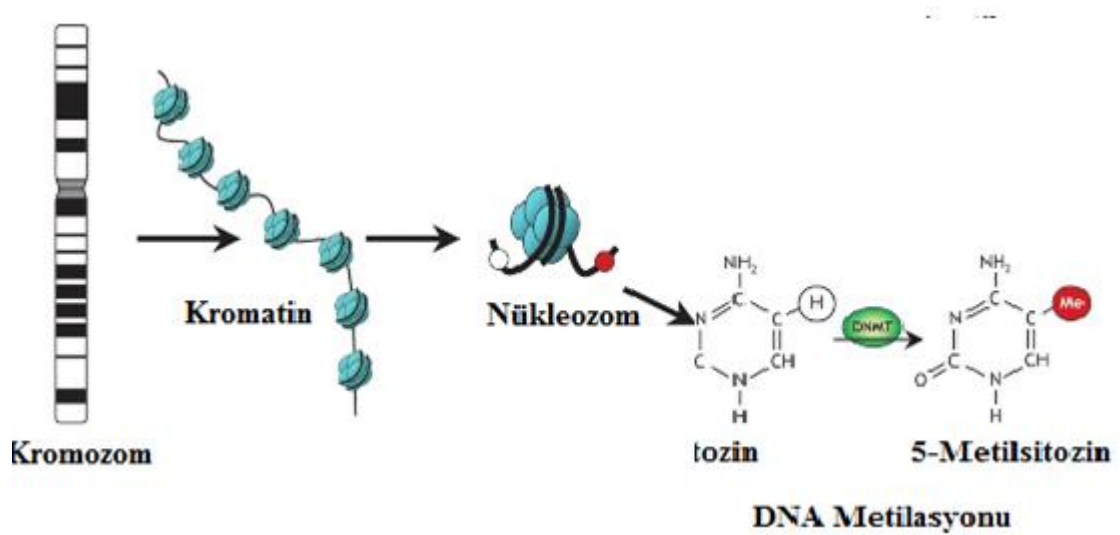
DNA metilasyonu en çok çalışılan epigenetik mekanizmadır.(3) DNA'nın bir dizisinde sitozin nükleotidinde bir metil grubunun kovalent olarak eklenmesi ya da çıkarılmasıdır (şekil 2.10'da gösterilmektedir) (Hamilton 2011). Metabolizmada gen baskılanmasının sağlanması gereken durumlarda gözlenmektedir (embriyonik gelişim, genomik imprinting, X kromozom inaktivasyonu gibi durumlarda). DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından kataliz edilen DNA metilasyonu CpG dinükleotitlerinde sitozinin 5 numaralı karbonunda meydana gelmektedir. (Enokida ve Nakagawa 2008, Bogdanovic ve Veenstra 2009, Sharma vd 2010, Hamilton 2011, Hoffman ve Cairns 2011, Jeronimo ve Henrique 2011, Kosova vd 2011, Sanchez-Carbayo 2012). Sitozinin 5. karbonuna metil donörü S-adenozilmetioninden (SAM) bir metil grubunun transferiyle, 5-metilsitozin (5-meC) meydana gelir (Jeronimo ve Henrique 2011, Kosova vd 2011, Majumdar vd 2011, Sanchez-Carbayo 2012). Normalde omurgalı DNA'sının %70'i metile durumdadır. Bu metilasyon durumu ise canlıdan canlıya, dokudan dokuya değişiklik göstermektedir. Özellikle genlerin promotor bölgelerinde metilasyon seviyelerinin düşük olduğu gözlenmektedir. Bu da aktif gen ifadesi ile metilasyon durumunun korelasyon gösterdiğini desteklemektedir.



Şekil 2.9. Epigenetik mekanizmalar: DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu (Web 9)

DNA metilasyonu gen ifadesinde önemli bir role sahiptir. Bir genin ifade edilip edilmeyeceğini belirleyen açık veya kapalı olması durumu da bu modifikasyonlarla belirlenir. Genin ifade edilip edilmemesindeki herhangi bir hata da kanser oluşumuna sebep oluşturabilecek önemli bir basamak olduğu için bu mekanizma kanser oluşumu yönünden önemlidir. Eğer herhangi bir metilasyonla onkogen aktivitesi sağlanır veya tam tersi yönde tümör baskılayıcı gen aktivasyonu inhibe edilirse kanser oluşumu tetiklenmiş olacaktır.

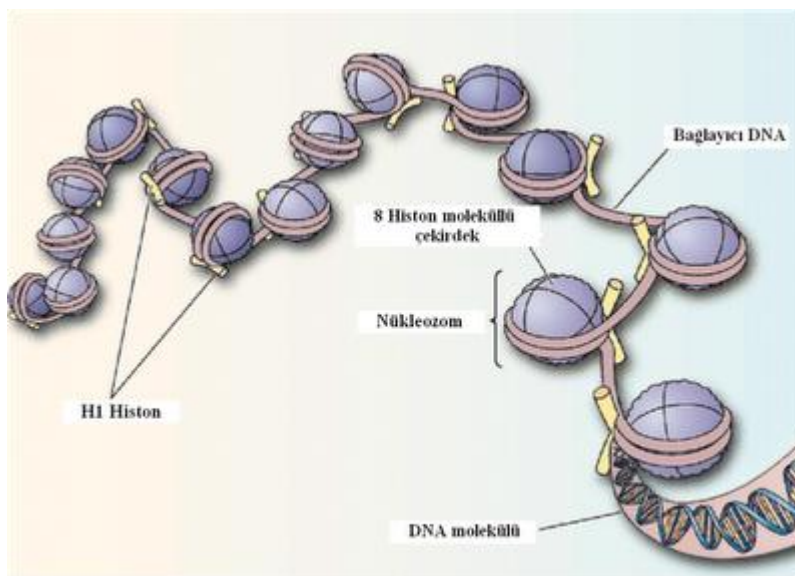
DNA metlasyonu metabolizmada gen baskılanmasının sağlanması gereken durumlarda gözlenmektedir. DNA metilasyonu, normal gelişim için gereklidir ve aynı zamanda gen ifadesinin baskılanması, embriyonik gelişim, transkripsiyon, kromatin yoğunlaşması, X kromozomu inaktivasyonu, imprinting, kromatin kararlılığının korunması, tekrarlayan genomik elemanların baskılanması, histon deasetilasyonu, genom güvenliği ve yapısal bütünlüğünün korunması ve karsinogenez gibi çeşitli süreçlerde fonksiyon gösterir (Bogdanovic ve Veenstra 2009, Kosova vd 2011, Majumdar vd 2011).



Şekil 2.10. DNA metilasyonu ve sitozine metil transferi (WEB_10)

Histon modifikasyonları ve kromatinin yeniden düzenlenmesi

Kromatin; DNA ve histon proteinlerden oluşan bir yapıdır. (Hamilton 2011). DNA paketlenmesinin ilk basamağını ise nükleozomlar oluşturmaktadır. Nükleozom; 146 baz çifti uzunluğundaki DNA zincirinin, ikişer adet H2A, H2B, H3 ve H4'ün bir araya gelmesiyle oluşturduğu "histon oktetimeri" etrafına sarılmasıyla oluşan kromatin yapısının tekrarlayan alt birimleridir. Oluşan nükleozomlar yapıda bağlaç bir DNA parçası (linker DNA) ile birbirine bağlanırlar. Bu linker DNA yapısına da H1 proteini ile tutunmaktadırlar.

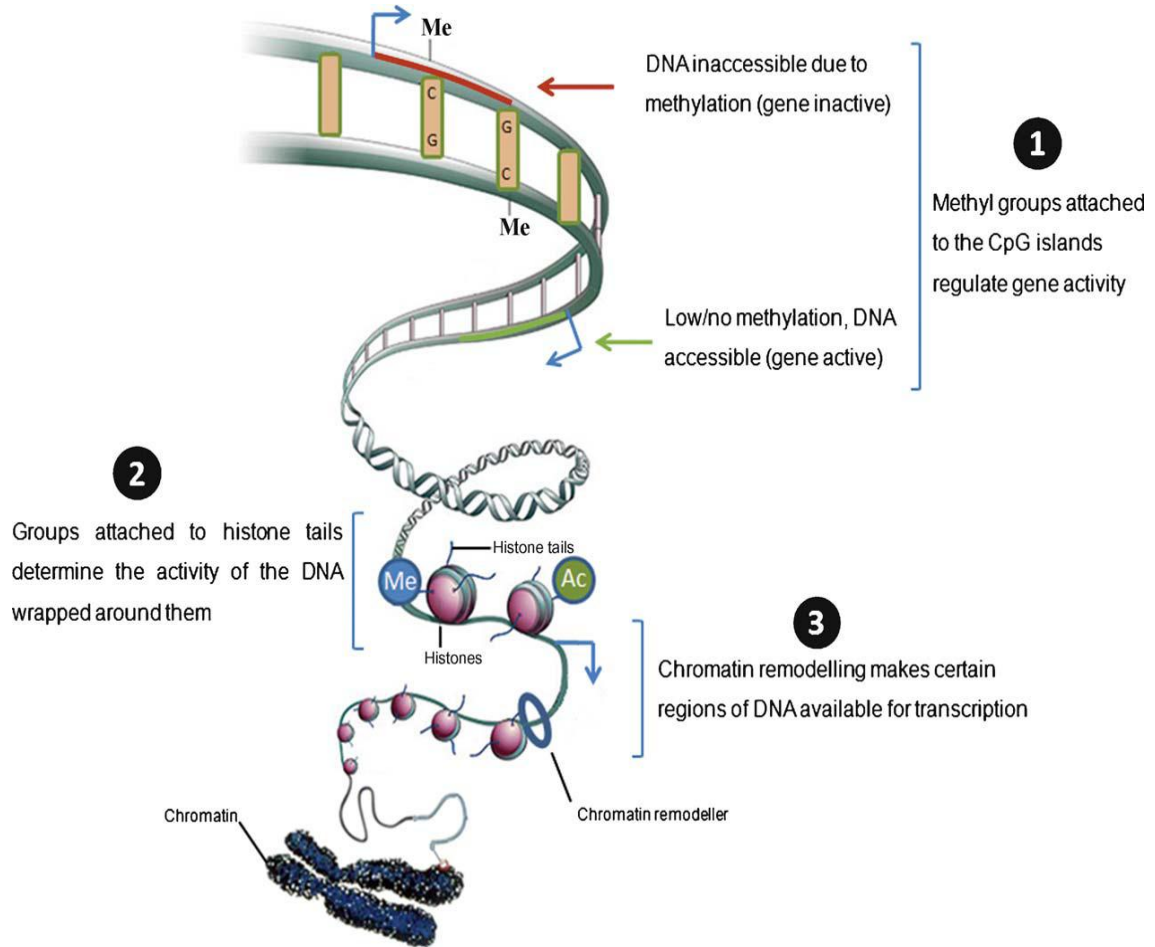


Şekil 2.11. Histon proteinleri ve DNA bileşeni ile oluşan oktetimer yapısı (Web 11)

Histon proteinleri, bir globüler C- terminal domaini ve yapılanmamış bir N- terminal kuyruk içeren, nükleozomun öz kısmını oluşturan proteinlerdir (Sharma vd 2010). DNA'nın paketlenmesinde görev alan histonların bazik amino terminal uçları nükleozom yapısından çıkıntı yaparak ;

- 1) Histon asetilasyonu/ deasetilasyonu
- 2) Histon metilasyonu
- 3) Serin veya treoninlerin fosforilasyonu
- 4) Glutamik asitlerin ADP- ribozilasyonu
- 5) Histon ubiquitinasyonu (Enokida ve Nakagawa 2008, Sharma vd 2010, Hamilton 2011, Hoffman ve Cairns 2011, Jeronimo ve Henrique 2011, Majumdar vd 2011,)

olmak üzere post - translasyonel değişimlere uğrayabilirler . Bu değişimler şekil 2.12'de şematize edildiği gibi bir yol izleyerek etkili olmaktadır.



Şekil 2.12. Kromotin yeniden modellenmesi (WEB 12)

2.2.4. Prostat Kanserinin Tipleri ve Histopatolojik Sınıflandırılması

Tablo 2.2. DSÖ'nün prostat tümörleri (2004) histolojik sınıflandırma

*Epitelyal Tümörler
Glanduler neoplazmlar
Adenokarsinom (Asiner)
Atrofik
Psödohiperplastik
Köpüksü
Kolloid
Taşlı yüzük hücreli
Onkositik
Lenfoepitelyoma benzeri
Karsinom ve spindle hücre differansiasyonu (Karsinosarkom, sarkomatoid karsinom)
Prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN)
Prostatik intraepitelyal neoplazi, grade III (PIN III)
Duktal Adenokarsinom
Kribriform
Papiller
Solid
Ürotelyal tümörler
Ürotelyal karsinom
Skvamoz tümörler
Adenoskuamoz karsinom
Skvamoz hücreli karsinom
Bazal hücreli tümörler
Bazal hücreli adenom
Bazal hücreli karsinom
Nöroendokrin tümörler
Endokrin differansiasyon gösteren adenokarsinom
Karsinoid tümör
Küçük hücreli karsinom
Paraganglioma
Nöroblastom
*Prostatik stromal tümörler
Potansiyeli belirlenemeyen stromal tümör
Stromal karsinom
*Mezenkimal tümörler
Leiomyosarkom
Rabdomyosarkom
Kondrosarkom
Anjiosarkom
Malign fibroz histiositom
Malign periferel sinir kılıfı tümörü
Hemanjiom
Kondrom

Leiomyom
Granüler hücreli tümör
Hemanjioperistom
Soliter fibroz tümör
*Hematolenfoid tümörler
Lenfoma
Lösemi
*Çeşitli tümörler
Kistadenom
Nefroblastom (Wilms tümörü)
Rabdoid tümör
Germ hücreli tümörler
Yolk sak tümörü
Seminom
Embriyonal karsinom ve teratom
Koryokarsinom
Berrak hücreli adenokarsinom
Melanom
*Metastatik tümörler

Asiner adenokarsinoma:

Salgı hücreleri içeren invaziv malign epitelial tümördür (Jonathan vd 2002). Prostat adenokarsinomu benign bezlerle ayırımı zor olabilen iyi diferansiye bez yapılarından, prostat kökenli olduğu zor anlaşılabilen kötü diferansiye tümörlere kadar değişen bir spekturumu içerir. Prostat adenokarsinomunun morfolojik özellikleri nükleer anaplazi, invazyon, ve yapısal bozukluktur.

İnvazyon; düzensiz bezler, bezlerden dışarıya tek tek düzensiz ilerlemeler yanı sıra perinöral invazyon şeklinde görülebilir. Yapısal bozukluk; uniform, kıvrıntılı bezler yerine küçük sırsırta vermiş bezler, birleşmiş bezler, kribriform yapılar, bez içinde bez, kordonlar ve solid adalar şeklinde olabilir (Eble vd 2004, Mostofi vd 1993).

Prostatın asiner adenokarsinom (AAK)'u, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından atrofik, psödohiperplastik, köpüksü, kolloid, taşlı yüzük, onkositik ve lenfoepitelyoma benzeri olmak üzere yedi histolojik alt tipe ayrılır. Bu histolojik alt tipler, yalnız başına bulunabildiği gibi klasik AAK'a eşlik de edebilir (Eble vd 2004, Carter vd 2004) Prostatta ender görülür ve literatürde bu güne kadar 68 olgu bildirilmiştir (Ahn vd 1991, Pedro vd 2006).Bu tümörlerin ekstraprostatik yayılımı sık olmakla beraber uzak organ metastazları sık rastlanan bir bulgu değildir (Minei vd 2001, McKenney vd 2004)

Prostat adenokarsinomunun makroskopik olarak tanımlanması, radikal prostatektomi örneklerinde genellikle zordur ve mikroskopik inceleme gereklidir . Bununla birlikte gri-sarımsak renkte, sınırları çevre dokudan tam olarak ayırt edilemeyen, sert bir alan olarak izlenir. Mikroskopik olarak prostat adenokarsinomu geniş bir spektrum sergiler; anaplastik tümörden, nonneoplastik gland ile ayırımı oldukça zor olan iyi diferansiye neoplazma kadar uzanır (Rosai ve Ackerman 2004)

Çoğu prostat adenokarsinomu, bir veya daha fazla pattern oluşturan asinulardan meydana gelir. Tanı, yapısal ve sitolojik bulguların kombinasyonuna bağlıdır. Işık mikroskopunda görülen özellikler tanı için genellikle yeterlidir. Fakat nadir olgularda immunhistokimyasal inceleme yararlı olabilir (Coter vd 2003)

Gland oluşturan karsinomlarda, glandlar prostat dokusuna göre daha kalabalık olarak izlenir. Prostat adenokarsinomunda glandlar tipik olarak gelişigüzel bir şekilde büyür. Glandlar birbirlerine dik olarak yerleşir İnfiltratif yapının diğer bir patterni büyük benign glandların arasında küçük atipik glandların yerleşmiş olmasıdır. Glandüler diferansiasyonun kaybı, kribriform şekilli formasyonlar, birleşmiş glandlar, şekli bozulmuş gland yapıları ile benign glandlar arasındaki ayırım, yapısal patterne dayalı olarak daha belirgin hale gelir. İndiferansiye prostat kanseri ise solid adalar, hücre kordları ve izole tek tek hücrelerle karakterizedir (Eble vd 2004).

Mikroskopik grade sistemi, Gleason ve beraberinde Veterans Administration Cooperative Urological Research Group (VACURG) tarafından geliştirilmiştir (Epstein , Rosai 2004).En yaygın olarak kullanılan grade sistemidir (Epstein 2004, De Marzo vd 2003).Glanduler diferansiasyonun derecesi, tümörün büyüme patterni ve stroma ile ilişkisi küçük büyütmede değerlendirilir. Hem primer (baskın) hem de sekonder (ikinci en sık) pattern saptanır. Grade 1 ile 5 arasında değerlendirilir. 1 en diferansiye, 5 en az diferansiye histolojik pattern gösterirse, primer ve sekonder pattern olarak aynı grade verilir. Gleason skor 2 (1+1) ile 10 (5+5) arasında değişir (Epstein , Rosai 2004). Gleason skor, primer ve sekonder patternin toplamından oluşur.

Biopside tanımlanan Gleason grade ile takip eden radikal prostatektomi örneklerinde izlenen grade oldukça tutarlıdır. Gleason skoru 5-6 olan biopsi örneklerinden sonra radikal

prostatektomilerinde %64 oranında aynı grade izlenmiştir. Gleason skoru 7 veya daha fazla olan biopsilerde ise bu oran %87.5 olarak bulunmuştur .

GLEASON MİKROSKOPİK GRADE SİSTEMİ

PCa agresifliğini derecelleyen histopatolojik metod Donald F. Gleason tarafından geliştirildi. Gleason skorlama sistemi 1960 ve 1975 yıllarındaki 4000' den fazla PCa hastasının biyopsi ve rezeksiyon örneklerinin histopatolojik incelemesi sonrası oluşturuldu (Gleason 1960)

Bu sistem, diğer tümör patolojik evreleme sistemlerinden farklı olarak tümörün sitolojik özellikleri yerine prostat dokusu içinde tümöre ait yapıların mikroskopik incelemesinde, düşük ve orta büyütmedeki yapısal düzenini temel almıştır. Tümör farklılaşması en iyiden en kötüye doğru ve 1' den 5' e kadar derecelenmiştir. Yapısal düzenlenmeye dayalı derecelemeye göre kendi içinde histolojik farklılıklar gösteren tümörlerde baskın ya da primer patern yanında ikinci sık görülen patern de kaydedilmektedir. Eğer tek patern izleniyorsa izlenen patern kendisi ile toplanmaktadır. Birinci ve ikinci patern sağkalım üzerine tek başlarına benzer korelasyon göstermekteyken iki paternin toplamı olan Gleason skoru sağkalım ile en güçlü korelasyonu göstermektedir (Harnden vd. 2007).

Günümüzde prostat kanseri seyrini öngörmeye en fazla kabul gören ölçüt Gleason derecesidir ve güvenilir bir evreleme sistemi olduğunu kanıtlamıştır (Epstein vd 1996, Partin vd 1997)

Tablo 2.3 Gleason Derecelendirmesi

Patern 1: Uniform, yakın düzenlenme gösteren, benign bezlere benzer oval, yuvarlak orta boy bezlerin oluşturduğu iyi sınırlı nodül şeklinde
Patern 2: İyi sınırlı, orta boy neoplazik bezlerin yer yer çevreye uzanım gösterdiği çeşitli şekil ve boyutta, benign bezlere benzer orta boy bezler şeklinde.
Patern 3: İnfiltratif, çeşitli boyut ve şekillerde bezler. Patern 1 ve 2 deki bezlerden küçük, aynı veya daha büyük bezler arada belirgin stromal alan mevcut
Patern 4: İnfiltratif, iç içe geçmiş bezler, kötü sınırlı, lümeni belirli olmayan küçük bezler, geniş kribriform yapılar, renal hücreli karsinoma benzer alanlar.

Patern 5: Glandüler diferansiyasyon olmaksızın solid alanlar, kordonlar, tek tek hücreler, ortalarında nekroz olan solid, kripriform yapılar. Gleason skoru, en fazla görülen patern ile ikincil görülen pa paternin toplanmasıyla elde edilir (Gleason skor 4+3=7 gibi). Sadece tek patern görüldüğünde skor paternin kendisiyle toplanması ile elde edilir (Gleason skor 3+3= 6 gibi).

Özellikleri: (Rosai 2004)

1- En nadir pattern olup genellikle yuvarlak, düzgün sınırlı uniform glandların sık olarak bir araya gelmesinden oluşmuştur.

2-Daha az uniform glandlar, gevşek olarak bir araya gelmiştir. Glandlar arasında az miktarda stroma bulunur ve kenarlar daha düzenlidir.

3a-Glandların ölçü ve şekillerinde büyük farklılıklar vardır. Sık olarak yerleşmişlerdir. Fakat düzensizdirler ve iyi sınırlı değildirler.

3b- 3a'ya benzer, çok küçük glandlar ve ufak hücre kumelerinden oluşur.

3c-Tümör papiller veya gevşek kribriform yapıların keskin ve düzgün sınırlı yuvarlak kitlelerinden oluşur. Bazı yazarlar bunu papiller intraduktal tümör olarak isimlendirmektedir.

4a-Düzensiz sınırlı, düzensiz infiltrasyon gösteren birleşmiş glandlardan oluşur.

4b-4a'ya benzer, beraberinde geniş soluk hücreler vardır.

5a-Santral nekrozlu, keskin dairesel yuvarlak kitle oluşturan, solid kribriform karsinom (komedokarsinom)

5b- Anaplastik karsinom, sadece adenokarsinom tanısı için yeterli gland ve vakuol formasyonu bulunur .

2.3. Metilasyon-spesifik MLPA (MS-MLPA)

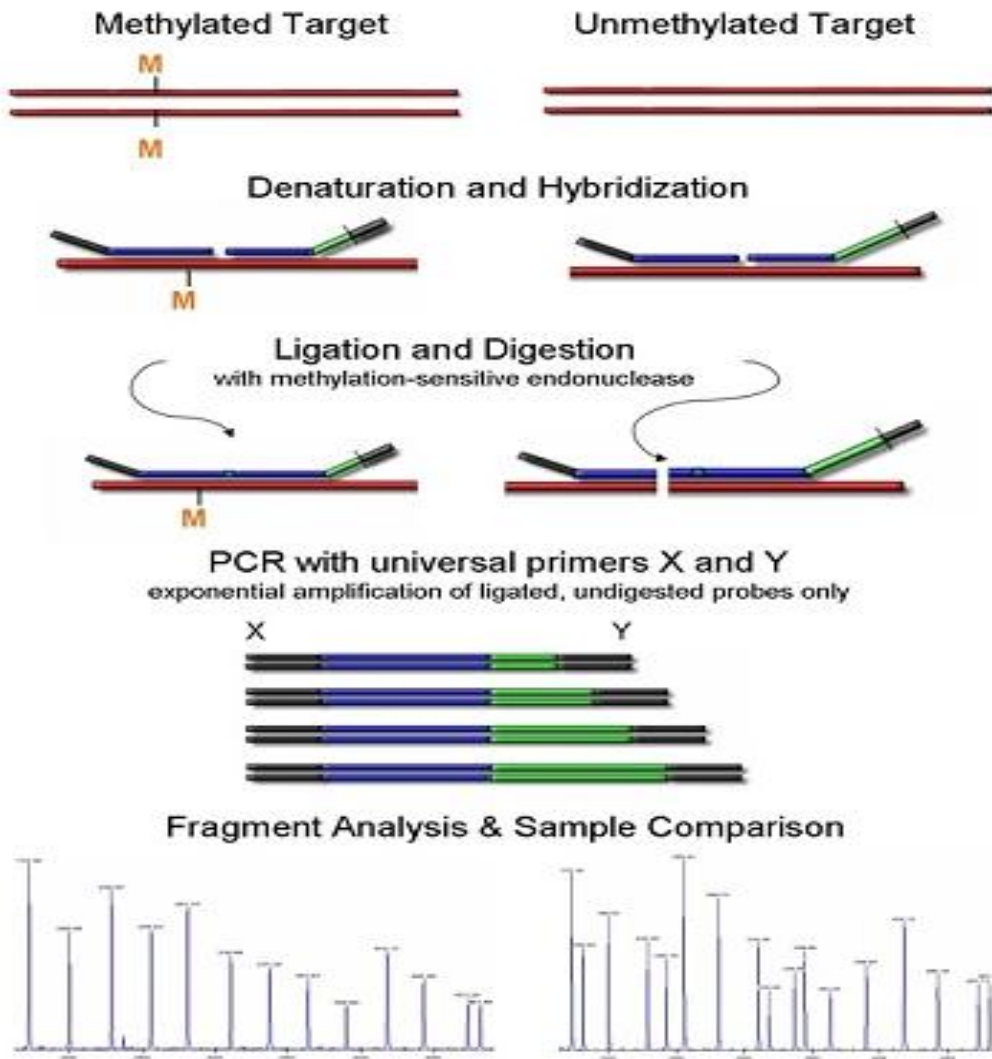
Metilasyon-spesifik multipleks ligasyon-bağımlı amplifikasyon yöntemi (MS-MLPA) tek bir deneyde birden fazla genin DNA promotör metilasyonundaki değişikliklerin yarı kantitatif tespitine izin veren polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı bir tekniktir. Metillenmiş ve metillenmemiş genler arasındaki ayırım, metilasyon-duyarlı restriksiyon enzimi HhaI için bir tanıma bölgesi içeren problemlerin belirlenmesine dayanmaktadır. MS-MLPA yöntemi, kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda uygulanmaktadır (Agundez vd 2011, Cabello vd 2011).

Metilasyon spesifik MLPA (MS-MLPA) metilasyon profili için bir yarı-nicel bir yöntemdir. MS-MLPA kopya sayısı tespiti bir metilasyon-duyarlı restriksiyon enziminin kullanılmasıyla kombine edilen MLPA tekniğinin bir çeşitidir (WEB_6, 2013).

MS-MLPA artık epigenetik değişikliklerin tespiti için yaygın olarak kullanılır. Başlıca uygulamalarından biri Prader Willi/Angelman ve Beckwith Wiedemann/RSS sendromu gibi imprinting hastalıklarda metilasyon tespitidir. MS-MLPA aynı zamanda tümör ilerlemesine ya da kemoterapötik ajanlara direnç yol açan tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel inaktivasyonunu incelemek için kullanıldığı tümör analizlerinde kullanılır. Anormal metilasyon paternlerinin tespiti, böylece daha yakından tümör tipinin incelenmesi için de kullanılabilir (Web_6, 2013).

MS-MLPA protokolü, her MS-MLPA reaksiyonu için iki örnekten oluştuğu dışında standart MLPA'ya çok benzerdir. Bu iki örnek şu şekildedir; kopya sayısı tespiti için bir parçalanmamış örnek ve metilasyon tespiti için bir parçalanmış örnek. MS-MLPA prosedürü 5 aşamaya ayrılabilir (Şekil2.): 1. DNA denatürasyonu ve MLPA problemlerinin hibridizasyonu, 2. Ligasyon ve parçalanma, 3. PCR, 4. Kapiller elektroforez ile amplifikasyon ürünlerinin ayrıştırılması, 5. Veri analizi. Metilasyon tespiti için MS-MLPA problemleri, hedef dizinin metilasyon-duyarlı endonükleaz HhaI'nin restriksiyon bölgesi içeriği dışında, diğer MLPA problemlere benzerdir. Diğer, hibridize edilmiş problemler ligasyona uğrarken (Şekil 2. Aşama 2) HhaI endonükleaz ortalaması ile inkübe edilir. Problemlerin hibridleri ve metillenmemiş DNA örneği HhaI enzimi ile parçalanır. Parçalanmış problemler PCR sırasında katlanarak amplifiye edilemez (Şekil 2. – Aşama 3) ve bu yüzden kapiller elektroforez sırasında bir sinyal üretmezler (Şekil 2.- Aşama 4). Aksine, örnek DNA

metillenirse DNA-prob hibridleri HhaI parçalanmasına karşı korunur ve bağlanmış problemler bir pik oluşturur



Şekil 2.13. MS-MLPA reaksiyonunun aşamaları (Web_13, 2013).

Çalışmamızda kullanılacak olan SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probemix içinde mevcut olan kontrol problemleri ve incelenecek genlere ait problemlerinin listesi Tablo 2.4'de verilmiştir.

Tablo 2.4 SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probemix içinde mevcut olan kontrol problemleri ve incelenecek genlere ait problemlerin listesi (Web_6, 2013 MRC Holland).

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA Prob	HhaI Bölgesi	Kromozomal pozisyon
64-70-76-82	Q-fragmentleri: DNA miktarı; en az 100 ng örnek DNA ile sadece görünür		
88-92-96	D-fragmentleri: 88 ya da 96 nt fragmentin düşük sinyali eksik denatürasyon gösterir		
100	X-fragmenti için spesifik		
105	Y-fragmenti için spesifik		
136	Reference (CREM) probe 00981-L00566	-	10p11.21
140	BRCA1 probe 03296-L01269	+	17q21.3
148	BRCA2 probe 02285-L01776	+	13q13.1
154	Reference (CFTR) probe 02944-L02376	-	7q31.2
160	ATM probe 03023-L02413	+	11q22.3
168	TP53 probe 02374-L02530	+	17p13.1
175	Reference (PTCH1) probe 03708-L03162	-	9q22.3
183	PTEN probe 03808-L02169	+	10q23.3
191	MGMT probe 05670-L05146	+	10q26.3
202	Reference (MLH3) probe 01245-L00793	-	14q24.3
208	PAX5 probe 03750-L03210	+	9p13.2
219	CDH13 probe 02257-L01742	+	16q23.3
229	Reference (PAH) probe 02334-L01820	-	12q23
238	TP73 probe 1684-L1264	+	1p36.3
247	WT1 probe 02755-L02204	+	11p13
256	Reference (PMP22) probe 01462-L00927	-	17p12
265	VHL probe 03818-L03850	+	3p25.3
273	GSTP1 probe 02747-L02174	+	11q13.2
281	Reference (TSC2) probe 01832-L01397	-	16p13.3
292	CHFR probe 02737-L02164	+	12q24.3
301	ESR1 probe 02746-L02173	+	6q25.1
310	Reference (CDK6) probe 03184-L02523	-	7q21.3

319	RB1 probe 02734-L02161	+	13q14.2
328	MSH6 probe 01250-L00798	+	2p16.3
337	Reference (APC) probe 01700-L01341	-	5q22.2
346	MGMT probe 13716-L15582	+	10q26.3
355	THBS1 probe 01678-L17140	+	15q14
364	CADM1 probe 03638-L17141	+	11q23
373	Reference (PTEN) probe 03638-L17142	-	10q23.3
382	STK11 probe 06783-L17143	+	19p13.3
390	Reference (KLK3) probe 00713-L00108	-	19q13.3
398	PYCARD probe 02252-L01737	+	16p11.2
409	PAX6 probe 03749-L03209	+	11p13
418	Reference (ATM) probe 02670-L02137	-	11q23
427	CDKN2A probe 01530-L00955	+	9p21.3
434	GATA5 probe 03752-L06199	+	20q13.3
445	Reference (IL2) probe 00627-L00183	-	4q27
453	RARβ probe 04046-L02172	+	3p24.2
462	CD44 probe 04500-L02761	+	11p13
472	RB1 probe 04502-L02199	+	13q14.2
483	Reference (CASR) probe 02683-L02148	-	3q21

3. MATERYAL VE METOD

5 temel basamakta araştırmamız gerçekleştirilmiştir:

1. Materyallerin toplanması,
2. FFPE doku örneklerinden genomik DNA izolasyonu,
3. İzole edilen genomik DNA rneklerinin konsantrasyonlarının ve saflık değerlerinin belirlenmesi,
4. İzole edilen DNA rneklerinin MS-MLPA yöntemiyle analizi,
5. İstatistiksel analiz.

3.1. Materyallerin Toplanması

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda, histopatolojik olarak incelenen "Prostat kanseri" tanısı almış 80 olgu çalışmaya dahil edildi. Çalışmada, olgulara ait %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş, parafin bloklara gömülü (FFPE) doku örnekleri kullanıldı. Tüm olgulardan tümör dokusunu en iyi yansıtan, içinde nekroz, kanama, inflamatuvar hücre ve stromal elemanların en az olduğu alanları içeren kesitler belirlenerek, bu kesitlere ait parafin bloklardan genomik DNA izolasyonu için 10 mikron kalınlığında ardışık seri kesitler alındı. Doku rneklerinin elde edildiği vakalara ait yaş, TNM evre ve Gleason Skorlaması gibi klinikopatolojik parametreler patoloji raporları incelenerek kaydedildi.

3.2. Formalinle Fikse Edilmiş Parafine Gömülü (FFPE) Prostat Dokularından Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen 80 olguya ait formalinle fikse edilmiş parafine gömülü doku örneklerinden genomik DNA izolasyonu, ticari kit (QIAamp DNA Mini Kit-Qiagen, Germany) yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Kitin içeriği ve kimyasal miktarları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

Tablo 3.1 DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit) içeriği

Kit İçerisindeki Bileşenler	Miktarlar (50 örnek için)
QIAamp Mini Spin Kolonlar	50 adet
Toplama Tüpleri (2ml'lik)	150 adet
AL Tamponu	12 ml
ATL Tamponu	10 ml
AW1 Tamponu (konsantre)	19 ml
AW2 Tamponu (konsantre)	13 ml
AE tamponu	22 ml
Proteinaz K	1.25 ml

DNA izolasyonuna başlamadan, kit de yer alan AW1 ve AW2 tamponlarının hazırlanma süreci üretici firmanın belirttiği şekilde ayrı ayrı 35 ml % 100 etanol ilave edilerek hazır hale getirildi.

Üretici firmanın belirttiği şekilde, formalinle tespit edilmiş parafine gömülü (FFPE) mesane dokularından DNA izolasyonu için aşağıdaki basamaklar sırayla uygulandı:

3.2.1. DNA İzolasyon Protokolü

1) Arşiv doku kesitlerinin etrafındaki fazla parafin, steril bistüri ve pens yardımı ile uzaklaştırıldı.

2) Fazla parafinden mekanik olarak arındırılan doku örnekleri yeni steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

3) Örneklere deparafinizasyon için 1200 µl ksilen (Sigma-Aldrich) ilave edildi ve 2200 rpm'de kuvvetlice vortekslendi (10 kez pulse-vorteks).

4) Örnekler 56 °C'ye ayarlı etüvde (Nüve) 16-18 saat gece boyu inkübasyona bırakıldı.

- 5) İnkübasyon sonrasında doku örnekleri oda ısısında (15-25 °C), 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- 6) Süpernatant mikropipet ile uzaklaştırıldı (Peletin dağılmamasına dikkat edildi).
- 7) Pelete tekrar 1200 µl ksilen ilave edildi.
- 8) Örnekler oda ısısında (15-25 °C), 14.000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildi.
- 9) Pelet kısmına dokunulmadan süpernatant mikropipetle uzaklaştırıldı.
- 10) Doku örneklerinde artık kalan ksileni uzaklaştırmak için peletlere 1200 µl etanol (Merck) (% 96-100) eklendi ve örnekler birkaç kez pulse-vorteks edildi.
- 11) Örnekler oda ısısında (15-25 °C), 14.000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildi.
- 12) Süpernatant mikropipetle uzaklaştırıldı (Peletin dağılmamasına dikkat edildi).
- 13) 10, 11 ve 12. basamaklar tekrar edildi.
- 14) Örneklerin bulunduğu mikrosantrifüj tüplerinin kapakları açılarak 37 °C'ye ayarlı etüvde, 15 dk inkübasyona bırakılarak, rezidüe etanolün tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- 15) Etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra peletler, kitle birlikte sağlanan 180 µl doku lizis tamponunda (Buffer ATL) süspanse edildi.
- 16) Örneklere, kitle birlikte sağlanan 20 µl proteinaz K eklendi ve vorteksenerek karıştırıldı. Daha sonra örneklere kısa bir santrifüj işlemi (short-spin) yapıldı.
- 17) Tüplerin kapakları parafilmle sarılarak, dokunun lizise olması için 56 °C'ye ayarlı su banyosunda 16-18 saat (gece boyunca) inkübasyona bırakıldı.
- 18) İnkübasyon sonrası tüpler santrifüjde kısa bir short-spin edildi.

19) Örneklere, 200 µl “AL Tamponu” eklendi ve 15 sn pulse-vorteks edilerek karıştırıldıktan sonra 70 °C’ye ayarlı su banyosunda 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüpler kısa bir santrifüj işlemi short-spin yapıldı.

20) Örneklere, 200 µl “Etanol” eklendi, 15 sn pulse-vorteks edilerek karıştırıldı ve sonra tüplere kısa bir short-spin yapıldı.

21) Kitle birlikte temin edilen, 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirilmiş “QIAmp Mini spin kolon” hazırlandı ve bir önceki basamakta elde edilen karışım bu kolonlara mikropipet aracılığıyla aktarıldı.

22) Kolonların kapakları kapatılarak, 8.000 rpm’de, 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonlar yeni 2 ml’lik toplama tüplerine yerleştirildi. Süzüntü bulunan toplama tüpü atıldı.

23) Kolonların kapakları açılarak, kolonlara kitle birlikte sağlanan 500 µl yıkama tamponu (AW1 Tamponu) eklendi. Kolonların kapakları kapatılarak 8.000 rpm’de, 1 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra kolonlar, kitle birlikte temin edilen temiz 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirildi ve süzüntü içeren toplama tüpleri atıldı.

24) Kolonların kapakları açılarak, içerilerine kitle birlikte sağlanan 500 µl yıkama tamponu (AW2 Tamponu) eklendi. Kolonların kapakları kapatılarak 14.000 rpm’de 3 dk santrifüj edildi.

25) Protokolün önerisi üzerine; temiz toplama tüplerine yerleştirilen kolonlar, 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.

26) Santrifüj işleminden sonra kolonlar steril 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Kolon kapakları açılarak içerilerine kitle birlikte sağlanan 100 µl elüsyon tamponu (AE Tamponu) eklendi ve oda sıcaklığında (15-25 °C), 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kolonlar 8.000 rpm’de, 1 dk santrifüj edilerek prostat doku örneklerinden genomik DNA izolasyonu tamamlanmış oldu.

27) İzole edilen DNA örnekleri çalışmanın diğer aşamalarına kadar -20 °C’de saklandı.

3.3. İzole Edilen Genomik DNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının ve Safılık Değerlerinin Belirlenmesi

Toplam 80 adet ‘Prostat kanser’ tanısı almış prostat doku örneklerinden izole edilen genomik DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları, spektrofotometrik yöntemle (Thermo, Nanodrop 2000C) belirlendi.

Konsantrasyon ölçümü öncesi, DNA örnekleri 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerinde 1/50 oranında sulandırılıp hazırlandı. Öncelikle, sulandırma için mikrosantrifüj tüplerine 49 µl Dnaz/Rnaz-free su konuldu ve izole edilen DNA’lardan 1 µl alınıp suyun içerisine bırakıldı ve mikropipetle pipetaj yapılarak homojenize edildi. 1/50 oranında sulandırılan DNA’lar daha sonra tek kullanımlık spektrofotometre küvetlerine aktarılıp, spektrofotometrenin dsDNA programında konsantrasyon ölçümü yapıldı. Ölçüm işleminden sonra 80 örneğe ait “Konsantrasyon, A260, A280, A260/280 değerleri” kaydedildi ve her bir örneğin “stok konsantrasyonları” hesaplandı. Sonuçta final DNA konsantrasyon değeri aşağıda gösterilen formülle hesaplandı:

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorbans (A260)} \times 50^* \times \text{Sulandırma Faktörü}$$

(* : Spektrofotometre cihazında 260 nm dalga boyunda alınan 1OD (optik dansite) değeri 50 µg/ml DNA konsantrasyonuna eşittir)

3.4. İzole Edilen DNA Örneklerinin MS-MLPA Yöntemiyle Analizi

İzole edilen DNA örneklerinde standart MLPA reaksiyonları gibi DNA denatürasyonu ve MLPA problemleri ile spesifik hedef DNA’ların bir gecelik hibridizasyonu aşamaları gerçekleştirildi.

3.4.1. DNA denatürasyonu ve SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probe mix hibridizasyonu

- Örneklerden elde edilen DNA'dan 5 µl (50-200 ng DNA) alındı.
- Örnekler 200 µl lik PCR strip tüplerine aktarıldı.
- 98 °C'de 5 dk. Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA'nın denatürasyonu sağlandı.
- Sonrasında Thermal Cycler cihazının kapağı açılmadan 25 °C'ye getirilip örnekler soğutuldu (Bu bekleme sırasında prob mix hazırlandı).
- Prob mix'in hazırlanışı; 1.5 µl SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probe mix ve 1.5 µl MLPA Buffer (Çalışılacak örnek sayısında bir fazla olacak şekilde prob mix hazırlandı) mikropipetle alınıp eppendorf tüpüne aktarılıp karıştırıldı.

Tablo 3.2. Prob mix'in içeriği

	1 ÖRNEK	10 ÖRNEK
SALSA PROBE MİX (Siyah Kapak)	1.5 µl	15 µl
MLPA BUFFER (Sarı Kapak)	1.5 µl	15 µl

- 25 °C'deki DNA örneklerinin üzerine 3 µl prob mix ilave edilip pipetaj ile homojenize edildi.
- Sonraki aşamada buharlaşmayı önlemek için PCR strip tüplerinin üzerine 5 µl mineral yağ eklenmeli (Biz bu aşamayı çalışmamızda uygulamadık).
- Daha sonra 95 °C'de 1 dk. İnkübe edilip, örnekler 60 °C'de 16 saat hibridizasyona bırakıldı (İnkübasyon süresi 16 saatten az 24 saatten fazla olmamalıdır).

3.4.2. Ligasyon ve enzim kesim reaksiyonu

Hibridizasyon sonrası reaksiyon iki ayrı tüpe bölünerek hem standart MLPA reaksiyonu hem de metilasyona spesifik yöntem uygulandı.

- Hibridizasyon süresi bitiminde Thermal Cycler cihazının ısısı oda sıcaklığına getirildi (54 °C).

- Ligaz 65 mix ve Ligaz 65 mix enzimli solüsyonlar hazırlandı (Çalışılacak örnek sayısından bir fazla olacak şekilde hazırlandı).

Tablo 3.3. Ligaz 65 mix içeriği

	1 ÖRNEK	10 ÖRNEK
H ₂ O	25 µl	250 µl
Ligaz-65 Buffer A (Saydam Kapaklı)	3 µl	30 µl
Ligaz-65 Buffer B (Beyaz Kapaklı)	3 µl	30 µl
Ligaz -65 (Yeşil Kapaklı)	1 µl	10 µl

Tablo 3.4. Ligaz-65 mix enzimli içerik

	1 ÖRNEK	10 ÖRNEK
H ₂ O	25 µl	250 µl
Ligaz-65 Buffer A (Saydam Kapaklı)	3 µl	30 µl
Ligaz-65 Buffer B (Beyaz Kapaklı)	3 µl	30 µl
Ligaz -65 (Yeşil Kapaklı)	1 µl	10 µl
HhaI enzimi		

- Termal cycler cihazındaki 54 °C'deki ayrılan örneklerin 1. tüp üzerine her örnek için 32 µl Ligaz-65 mix ilave edilerek pipetajla karıştırıldı.
- 2. tüpe her örnek için 10 µl Ligaz-65 mix enzimli ilave edilerek pipetajla karıştırıldı.
- 54 °C'de 15dk bekletildi
 - Hibridizasyon ürününe her örnek için 3µl Ligaz-65 buffer A ve 10µl su ilave edildi ve pipetajla karıştırıldı.
 - Bu karışımın 10µl'si ikinci bir tüpe aktarıldı.
 - Her iki tüp Termal Cycler cihazında en az 1 dakika 49 °C'de inkübe edildi.
 - İlk tüpe 49 °C'de 10 µl Ligaz-65 karışımı ilave edildi (Kopya sayısı testi).

- İkinci tüp yine 49 °C’de 10 µl içinde Hha1 enziminin de olduğu Ligaz-Kesim karışımı ilave edildi (Metilasyon testi).
- Her iki tüp 49 °C’de 30 dk. İnkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra 98 °C’de 5 dk. Bekletilerek ligaz inaktivasyonu sağlandı.

Ligaz-65 Karışımı: Her örnek için 1.5µl Ligaz-65 buffer B (beyaz kapaklı), 8.25µl su, 0.25µl Ligaz-65 enziminin (yeşil kapaklı) karıştırılmasıyla hazırlandı.

Ligaz-Kesim Karışımı: Her örnek için, 1.5µl Ligaz-65 buffer B (beyaz kapaklı), 7.75µl su, 0.25µl Ligaz-65 enzimi (yeşil kapaklı) ve 0.5µl Hha1 enziminin (10 ünite/µl) karıştırılmasıyla hazırlandı.

3.4.3. Amplifikasyon (PCR)

Hem standart MLPA reaksiyonu hem de metilasyona spesifik MLPA işlemleri yapılan tüplerin amplifikasyonları yapıp kapiller jel elektroforez cihazında değerlendirilebilmek için aşağıdaki protokollerle PCR işlemine tabi tutuldu.

- Ligasyon ve enzim kesim reaksiyonu ürününden 5 µl alınarak yeni PCR strip tüplerine aktarıldı.
- Daha sonra ligasyon ve enzim kesim ürünü konmuş her strip tüpüne sırasıyla:
 - 2 µl SALSA PCR buffer (kırmızı kapaklı)
 - 13 µl distile su
 - 5 µl Polimeraz miks,
 konularak PCR başlatıldı.

- **Polimeraz miskin hazırlanışı:** Her PCR reaksiyonu için; 1 µl SALSA PCR-primer (kahverengi kapaklı), 3.75 µl distile su ve 0.25 µl SALSA polimeraz (turuncu kapaklı) eklenerek iyice karıştırıldı.

5.PCR şartları: 35 döngü için

Denatürasyonda: 95 °C’de 30 saniye
 Annealingde: 60 °C’de 30 saniye
 Ekstansiyonda: 72 °C’de 60 saniye beklendi.

En son Final Ekstansiyonda: 72 °C’de 20 dakika inkübe edildi.

3.4.4. Beckman Coulter CEQ™ 8000 Genetic Analysis System cihazına yükleme

- PCR bitiminde elde edilen ürünlerden 3 µl alınarak Beckman Coulter CEQ™ 8000 genetik analiz sistem cihazının yükleme tüplerine aktarıldı.

- Daha sonra üzerlerine: 0.5 µl internal size standart (Rox 500) ve 12 µl deiyonize formamid konularak pipetajla homojenize edildi.

- Örnekler 94 °C’de 4 dk Thermal Cyler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlandı.

- Devamında örnekler buz üzerine alındı.

- Beckman Coulter CEQ™ 8000 genetik analiz sistem cihazında; 15 kV’de 5 saniye injeksiyon zamanı, 60 °C’de ve 15 kV’de 25 dakika yürütme zamanı, filitre C şartları sağlandı.

- Daha sonrasında örnekler Beckman Coulter CEQ™ 8000 genetik analiz sistem cihazına yüklenilerek, Gene Mapper programında okutulmaya başlandı.

- Her örneğe ait pik görüntüleri elde edildi.

3.4.5. Değerlendirme

Normal MLPA çalışmalarının değerlendirme basamağında, okutulan örneklerin pik alanları ve prob uzunlukları 44TERT dosyası formatında kaydedilir. Spesifik olmayan amplifikasyon pik ürünleri kaldırılır. Normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA ürünlerinin pik alanları kaldığında problemlerin elde edilen boyut ve pik alanları MLPA analiz programlarıyla değerlendirilir.

MS-MLPA yönteminde hasta değerlendirme şekli diğer MLPA problemlerine göre farklılıklar göstermektedir: Normal MLPA çalışmalarının değerlendirmesinde, hastalara ait DNA’lardan elde edilen pik alanlarının diğer sağlıklı kontrollere ait pik alanlarıyla karşılaştırılması büyük önem taşır. MS-MLPA’da ise pik alan ve büyüklüğü değil, pikin varlığı ya da yokluğunun belirlenmesi yeterli olmaktadır. MS-MLPA çalışmasında örnekler iki gruba ayrıldı. Bir grupta normal MLPA reaksiyonu gerçekleştirilirken diğerinde metilasyona duyarlı enzim reaksiyonu gerçekleştirildi. Çalışmanın sonucunda bir örneğe ait iki ayrı reaksiyondan elde edilen ürünlere ait pik görüntüsü elde edildi.

Çalışmamızda metilasyon değerlendirilmesi hedeflendiği için enzim ile kesimi yapılmış örneklerle ait pikler analiz edildi. Ancak yöntemin kendi içinde oluşturduğu internal kontrol basamağı olarak ilk etapda enzim ile kesime tabi tutulmamış örneklerle ait pikler incelenerek, araştırılacak genlerin, prob bölgelerinin varlığı kontrol edildi. Bu kontrol sonrasında herhangi bir pik kaybı olmayan örnekler ile ikinci aşamaya geçildi.

Değerlendirmenin ikinci aşamasında enzim kesimine tabi tutulmuş örneklerden elde edilen pik görüntüleri incelendi. Kullanılan kit içerisinde kontrol prob bölgeleri bulunmaktadır. Normal koşullarda sadece kontrol bölgelerine ilişkin pikler elde edilir. Prob bölgelerinde metilasyona spesifik endonükleazlara özgü tanıma bölgeleri bulunmadığından enzim ile kesim olmamakta, ligasyona bağlı olarak pikler elde edilmektedir. Bu kontrol bölgelerine ait piklerden başka pik olup olmadığı Genemapper programı ile değerlendirilir. Çalışmamızda kullandığımız metilasyon spesifik bir restriksiyon enzimi olan HhaI, tanıdığı bölgelerin metile olmaması durumunda diziyi keserek, ligasyon oluşmasını engeller. Böylece bu prob bölgesi PCR ile çoğaltılamaz ve pik elde edilemez. Eğer incelenen prob bölgesi 45 TERT45nmış ise HhaI enzimi bu prob dizisini kesemez. Kesilmeyen prob bölgesinde ligasyon işlemi gerçekleşir ve ligasyon ile birleştirilen proplar PCR ile amplifiye olur. Amplifiye olan proplardan da pik elde edilir. Sonuç olarak HhaI enzimi ile kesim işlemine tabi tutulan örnekler incelendiğinde, HhaI enzim kesim bölgesi içermeyen kontrol pikleri dışında saptanan ekstra pikler, karşılık gelen prob bölgesinin dolayısıyla bu proba spesifik gen bölgesinin metile olduğunu ifade etmektedir. Bu kriterler doğrultusunda çalışmamızda örnekler Genemapper programı ile tek tek incelenerek metile olan prob bölgeleri tespit edildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Prostat kanseri ile ilişkilendirilmiş tümör baskılayıcı genlerin metilasyon paternleri ile yaş, TNM sınıflaması ve Gleason Skorlaması olmak üzere klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişkinin belirlenmesi için SPSS programı (version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanıldı ve tüm analizler için ki-kare testi yapıldı. Elde edilen sonuçlar için $p \leq 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. DNA Örneklerinin Konsantrasyonları ve Saflık Değerleri

Toplam 80 adet prostat kanser tanısı almış olgunun prostat dokularından izole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon değerleri ve saflık dereceleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 DNA örneklerinin konsantrasyon değerleri ve saflık değerleri

Örnek No	Konsantrasyonbirimini yaz	A260	A280	A260/280	A260/230
1	204,2	4,08	2,02	2,02	2,07
2	91,3	1,82	0,93	2,11	2,11
3	60,2	1,2	0,58	2,04	0,48
4	404,7	8,09	4,08	1,98	2,17
5	207,7	4,15	2,1	1,98	1,89
6	538,5	10,77	5,54	2,2	2,2
7	861,8	17,23	8,79	2,23	2,23
8	306	6,12	2,99	2,04	2,12
9	220,1	4,4	2,12	2,08	2,01
10	184,6	3,69	1,87	1,97	1,97
11	428,1	8,56	4,25	2,01	2,13
12	150,8	3,01	1,45	2,07	1,9
13	88	1,76	0,86	2,04	2,12
14	374	7,47	3,75	2	2,11
15	451,2	9,02	4,56	1,98	2,11
16	597,7	11,95	6,86	1,97	2,26
17	135,9	2,71	1,36	2	2,06
18	292,5	5,84	2,94	2	1,35

19	697,9	13,95	7,1	1,96	2,22
20	174,5	3,49	1,73	2,02	2,03
21	281,1	5,62	2,83	1,98	1,95
22	186,5	3,73	1,82	2,05	2,12
23	421,3	8,42	4,18	2,02	1,89
24	730,8	14,61	7,52	1,94	2,24
25	41,9	0,83	0,45	1,86	1,38
26	70,4	1,4	0,69	2,01	1,7
27	174	3,48	2,27	1,53	0,77
28	145,8	2,91	1,4	2,08	1,98
29	253,6	5,07	2,46	2,06	1,99
30	407,5	8,15	3,93	2,07	2,07
31	101,5	2,03	1	2,02	2,12
32	25,3	0,5	0,26	1,94	1,23
33	215,8	4,31	2,06	2,09	2,06
34	155,2	3,1	1,55	2	1,24
35	150,2	3	1,47	2,04	1,87
36	9,9	0,19	0,1	2,48	0,34
37	65,1	1,3	0,63	2,05	1,98
38	131,2	2,62	1,29	2,02	1,72
39	114,4	2,28	1,18	1,94	2,12
40	182,1	3,64	1,81	2,01	1,99
41	64	1,28	0,66	1,92	1,83
42	321,5	6,43	3,16	2,03	2,1
43	401,8	8,03	3,91	2,06	2,14
44	201,8	4,036	1,99	2,02	2,12
45	285,1	5,7	2,75	2,07	2,08
46	140,4	2,8	1,4	2,01	1,94
47	69,6	1,39	0,73	1,9	1,77
48	203,7	4,075	1,99	2,04	2,14
49	300	0,599	0,326	1,84	1,91
50	144,1	2,88	1,48	1,94	1,9
51	77,3	1,54	0,77	2	0,95

52	293,9	5,87	3,08	1,91	1,49
53	546,1	10,92	5,46	2	2,07
54	91,4	1,82	0,91	2,01	0,63
55	100,4	2	0,98	2,05	1,26
56	45,6	0,91	0,44	2,06	1,7
57	217,8	4,35	2,12	2,05	1,79
58	54,5	1,09	0,63	1,72	0,74
59	92,7	1,85	0,91	2,03	1,42
60	270,9	5,41	2,62	2,07	1,84
61	78.3	1.567	0.75	2.09	1.34
62	265	5.299	2.547	2.08	1.17
63	322.5	6.449	3.15	2.05	1.64
64	119.5	2.389	1.138	2.1	0.82
65	74.5	1.49	0.748	1.99	0.66
66	222.2	4.445	2.186	2.03	0.92
67	522.6	10.451	5.135	2.04	2
68	125.8	2.517	1.234	2.04	1.92
69	572	11.44	5.517	2.07	2.01
70	196.1	3.922	1.909	2.06	1.81
71	229.4	4.587	2.204	2.08	1.27
72	257.4	5.149	2.474	2.08	1.83
73	304.6	6.092	2.947	2.07	1.77
74	316	6.321	3.034	2.08	1.59
75	58.2	1.163	0.567	2.05	0.69
76	306.9	6.138	3.031	2.02	1.83
77	178.6	3.571	1.715	2.08	2.01
78	193.8	3.877	1.962	1.98	1.27
79	224.1	4.482	2.179	2.06	1.91
80	111.5	2.23	1.081	2.06	2.03

4.2. Prostat Kanseri Tanısı Almış Olgulara Ait Klinikopatolojik Parametreler

Çalışmamıza 80 adet prostat kanseri tanılı hasta ile başlanmıştır fakat çalışma sonunda 4 hastaya ait klinikopatolojik parametrelere ait verilere ulaşılamadığı için çalışmamız 76 prostat kanserli hasta üzerinden gerçekleştirilmiştir.

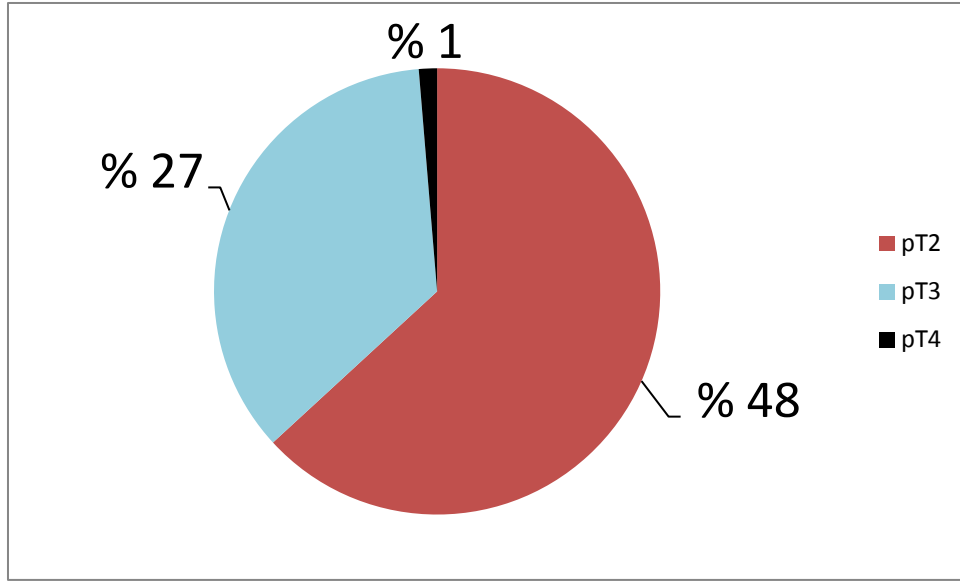
Tablo 4.2 Prostat kanseri tanısı almış 76 hastanın klinikopatolojik özellikleri

Parametre	Hasta sayısı (%)
<u>Yaş</u>	
≥ 65	25 (% 32.89)
< 65	51 (% 67.11)
<u>Cinsiyet</u>	
Kadın	0 (% 0)
Erkek	76 (% 100)
<u>TNM sınıflaması</u>	
T sınıflaması	
pT2	48 (% 63.16)
pT3	27 (% 35.52)
pT4	1 (% 1.32)
N sınıflaması	
N0	0 (% 0)
M sınıflaması	
M0	0 (% 0)
<u>Gleason Skoru</u>	
< 7	26 (% 34.21)
≥ 7	50 (% 65.79)

Hastaların yaşlarına bakıldığında, 25 (% 32.89) tanesi 65 yaş ve üstünde, ve 51 (% 67.11) tanesinin 65 yaşından küçük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Patolojik evre, patolojik tarafından tümörün mikroskop yardımı ile değerlendirildiği evredir ve T0, Tis, T1, T2a, T2b, T3a, T3b, T4a ve T4b olmak üzere belirlenmiştir.

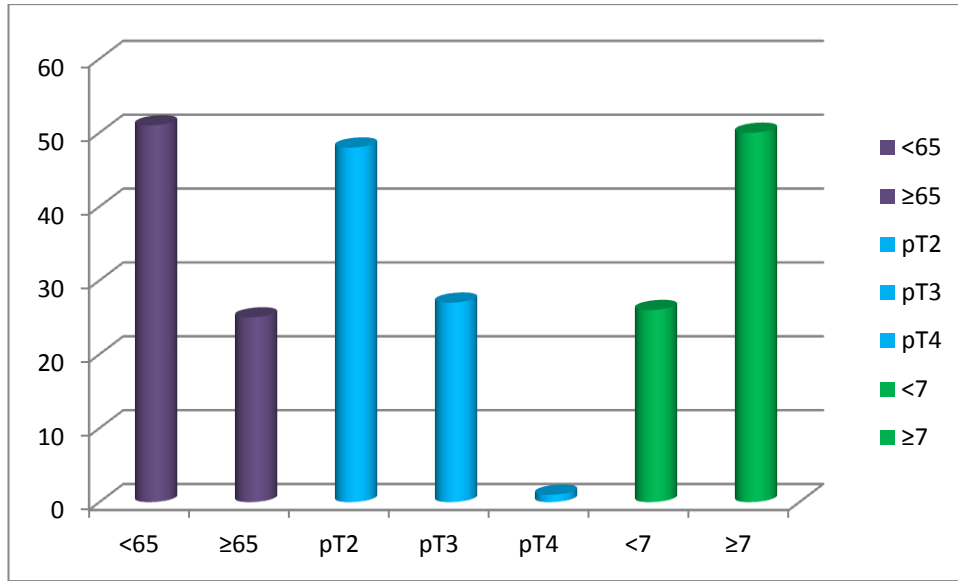
Patolojik evreye göre, pT2'de 48 (% 63.16) hasta, pT3'de 27 (% 35.52) hasta, pT4'de 1 (% 1.32) hasta bulunmaktadır (Tablo 4.2, Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Patolojik evreye göre alt grupların yüzdelik dağılımı

Tümörlerin N-evre sınıflaması, bölgesel lenf nodu metastazına dayanmaktadır ve Nx (Bölgesel lenf nodu değerlendirilemedi), N0 (Bölgesel lenf nodu metastazı yok), N1 (2 cm ya da daha küçük tek lenf nodu metastazı var), N2 (2-5 cm arası boyutlarda tek lenf nodu ya da 5 cm'den küçük multipl metastaz var) ve N3 (Boyutu 5 cm'den büyük lenf nodu metastazları var) olmak üzere gruplandırılmıştır. Bu gruplandırmaya göre, hastaların 76 (% 100) tanesinde bölgesel lenf nodu metastazının olmadığı belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen vakalarda uzak metastaz olduğu tespit edilmemiştir ve tümü M0 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2).

Gleason skoruna göre, 76 hastanın, 26 (% 34.21) tanesinin 7'den küçük (<7), 50 (% 65.79) tanesinin 7'den büyük ve eşit (≥ 7) olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.2).



Şekil 4.2. Prostat kanserli 76 hastanın klinikopatolojik dağılımları(yaş evre ve gleason skoru tabloya yerleştir.

Şekil 4.2'ye bakıldığında, hasta grupları arasında yaş grubuna göre 65 yaşın altındaki hastaların 65 yaşın üstündekilerden fazla olduğu, tümör sınıflamasına göre pT2 grubunun en fazla olduğu, Gleason Skorlamasına göre 7'den büyük skora sahip hastaların daha fazla olduğu gözlenmektedir.

4.3. Metilasyon Profili

Prostat kanser tanısı almış 76 olgunun formalinle fiske edilmiş parafine gömülü mesane dokusundan elde edilen DNA'lardan MS-MLPA prob seti (ME002-B1 tumor supressor probe mix, MRC, Hollanda) kullanılarak, *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *TP53*, *PTEN*, *MGMT*, *PAX5*, *CDH13*, *TP73*, *WT1*, *VHL*, *GSTP1*, *CHFR*, *ESR1*, *RBI*, *MSH6*, *MGMT-2*, *THBS1*, *CADM1*, *STK11*, *PYCARD*, *PAX6*, *CDKN2A*, *GATA5*, *RARβ*, *CD44*, *RBI-2* olmak üzere toplam 25 tümör baskılayıcı genin promotör CpG dinükleotidlerindeki hipermetilasyonunun eş zamanlı olarak Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi ile metilasyon paternleri belirlenmiştir.

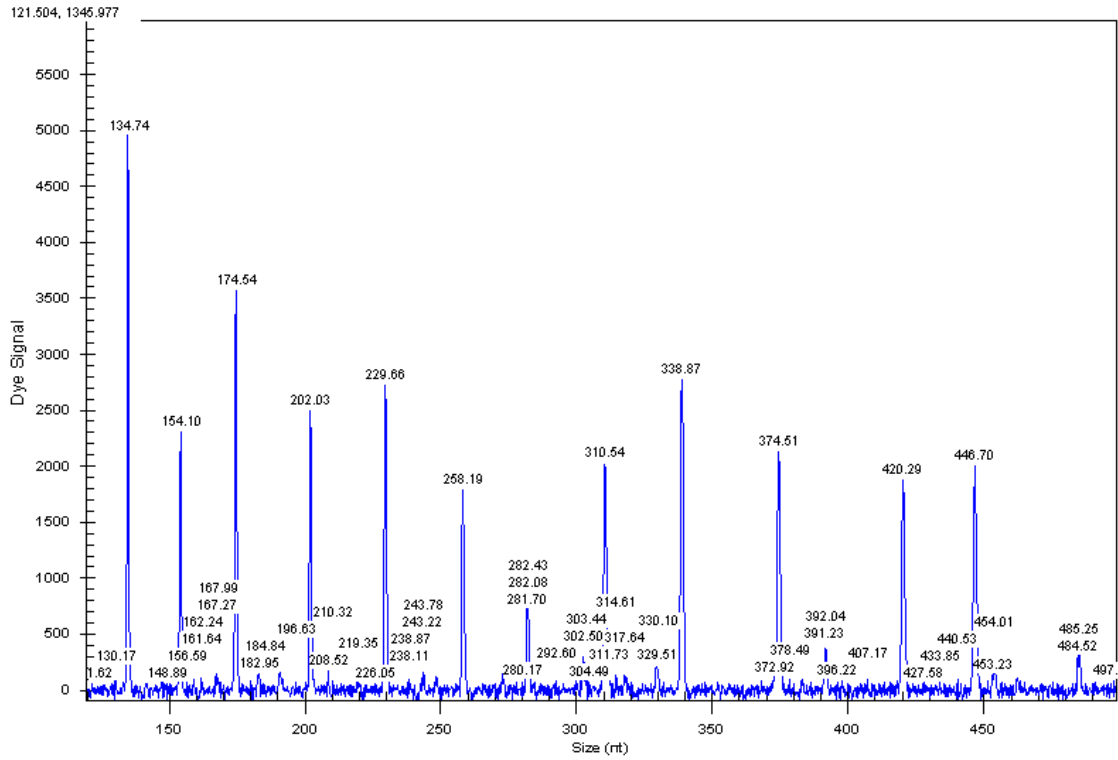
Prostat kanser tanısı almış 76 hastada 25 tümör baskılayıcı gen için belirlenen metilasyon yüzdeleri Tablo 4.3'de gösterilmektedir.

Tablo 4.3 Prostat kanser tanısı almış 76 hastada kullanılan MS-MLPA ME002-B1 prob setinde yer alan genlerin açılımı ve belirlenen metilasyon yüzdeleri

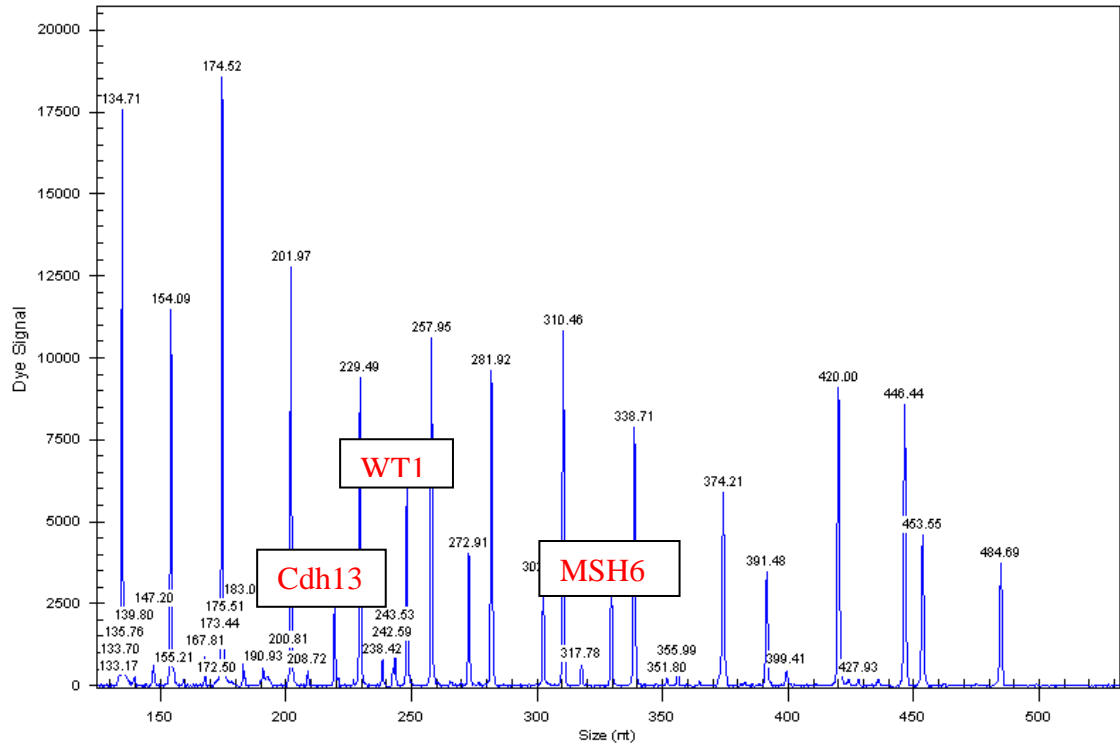
Gen	Genin açık ismi	Metilasyon yüzdesi (%)
<i>BRCA1</i>	Meme kanseri 1	1.32
<i>BRCA2</i>	Meme kanseri 2	0
<i>ATM</i>	Ataksi telanjiektazi mutasyonu	3.95
<i>TP53</i>	Tümör proteini <i>p53</i>	7.89
<i>PTEN</i>	Fosfataz ve tensin homoloğu	1.32
<i>MGMT</i>	O6- metil guainin DNA metil transferaz	2.63
<i>PAX5</i>	Box 5 geni	0
<i>CDH13</i>	Kaderin 13, H-kaderin	23.68
<i>TP73</i>	Tümör proteini <i>p73</i>	23.68
<i>WT1</i>	Wilms tümör geni 1	17.11
<i>VHL</i>	Von Hippel-Lindau	0
<i>GSTP1</i>	Glutasyon S- transferaz Pi geni	31,57
<i>CHFR</i>	checkpoint with forkhead and ring finger domains	0
<i>ESR1</i>	Östrojen reseptör 1	17.11
<i>RBI</i>	Retinoblastoma 1	14.47
<i>MSH6</i>	mutS homolog 6	40.79
<i>THBS1</i>	Thrombospondin 1	3.95
<i>CADM1</i>	Hücre adezyon molekülü 1	0
<i>STK11</i>	Serin/treonin kinaz 11	0
<i>PYCARD</i>	<i>PYD</i> ve <i>CARD</i> domaini	1.32

<i>PAX6</i>	Box 6 geni	1.32
<i>CDKN2A</i>	Siklin-bağımlı kinaz inhibitör 2A	0
<i>GATA5</i>	<i>GATA</i> bağlanan protein 5	0
<i>RARβ</i>	Retinoik asit reseptörü β	34.21
<i>CD44</i>	Kaderin 44	18.42

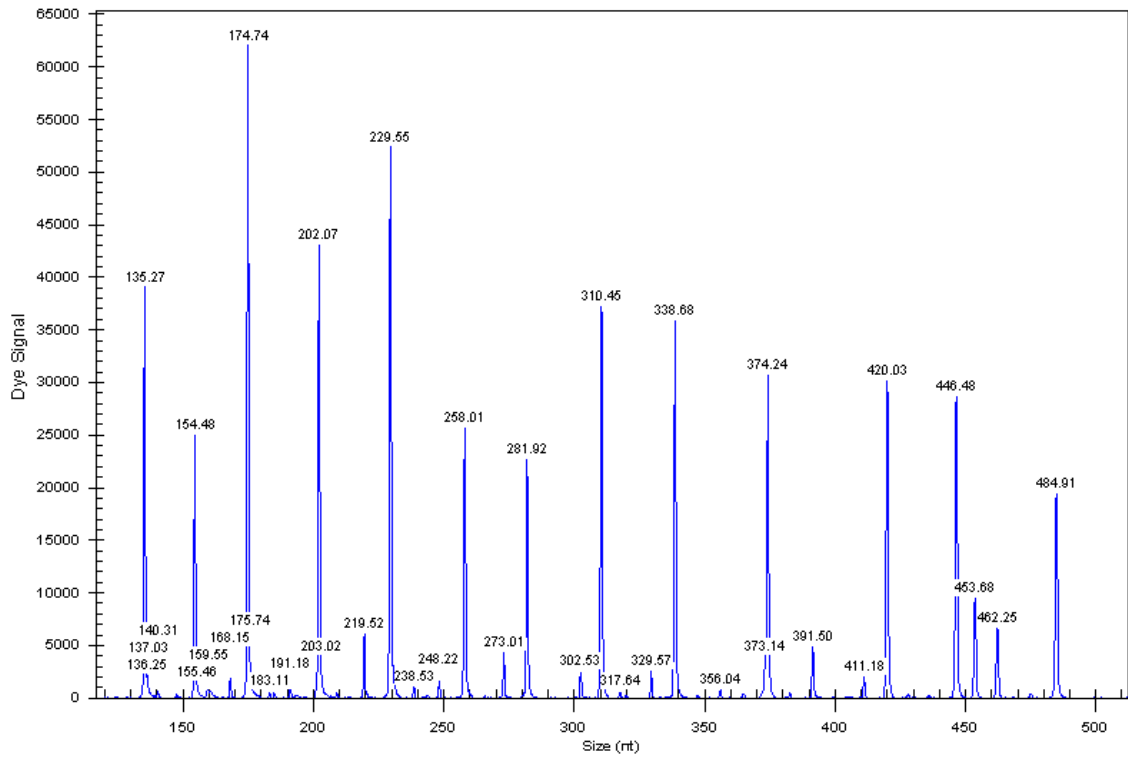
Prostat kanser tanısı almış 76 hastada MLPA yöntemiyle saptanan metilasyona uğramış genlerin pik görüntüleri Şekil 14.1'den Şekil 4.10'a kadar gösterilmiştir.



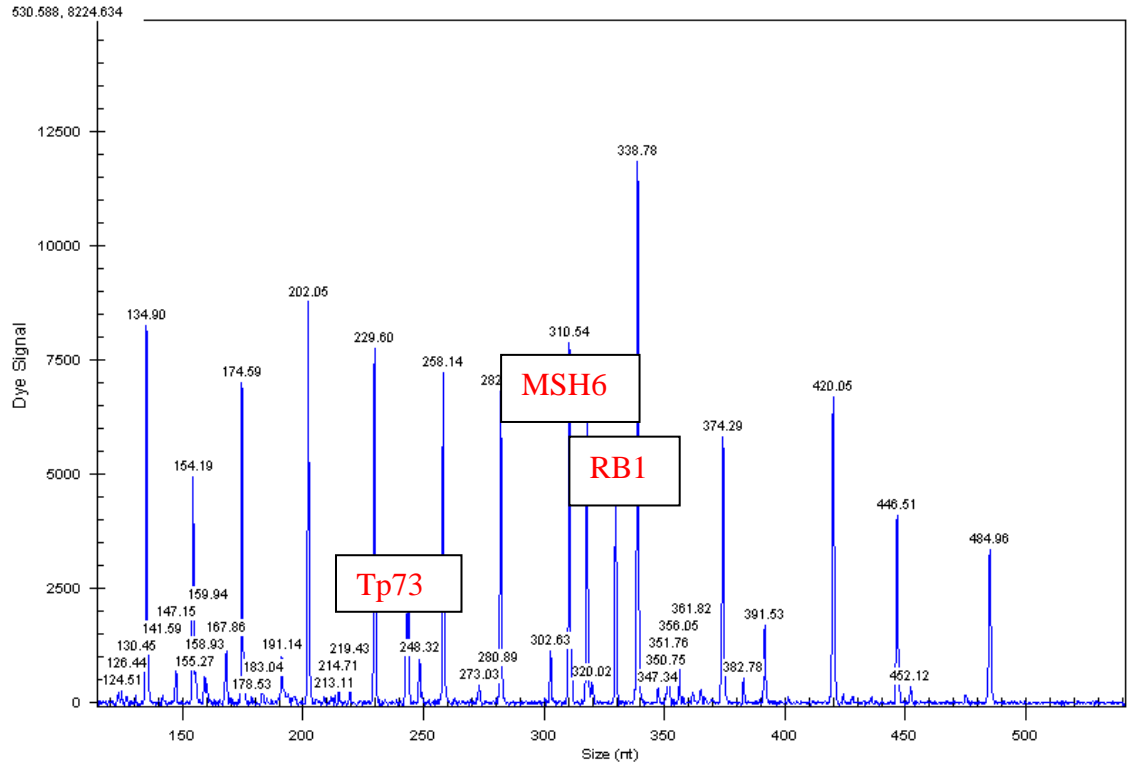
Şekil 4.3. Normal metilasyon profiline bir hastanın prostat kanser dokusuna ait enzim kesimi yapılmış MLPA görüntüsü (61 nolu hasta örneği)



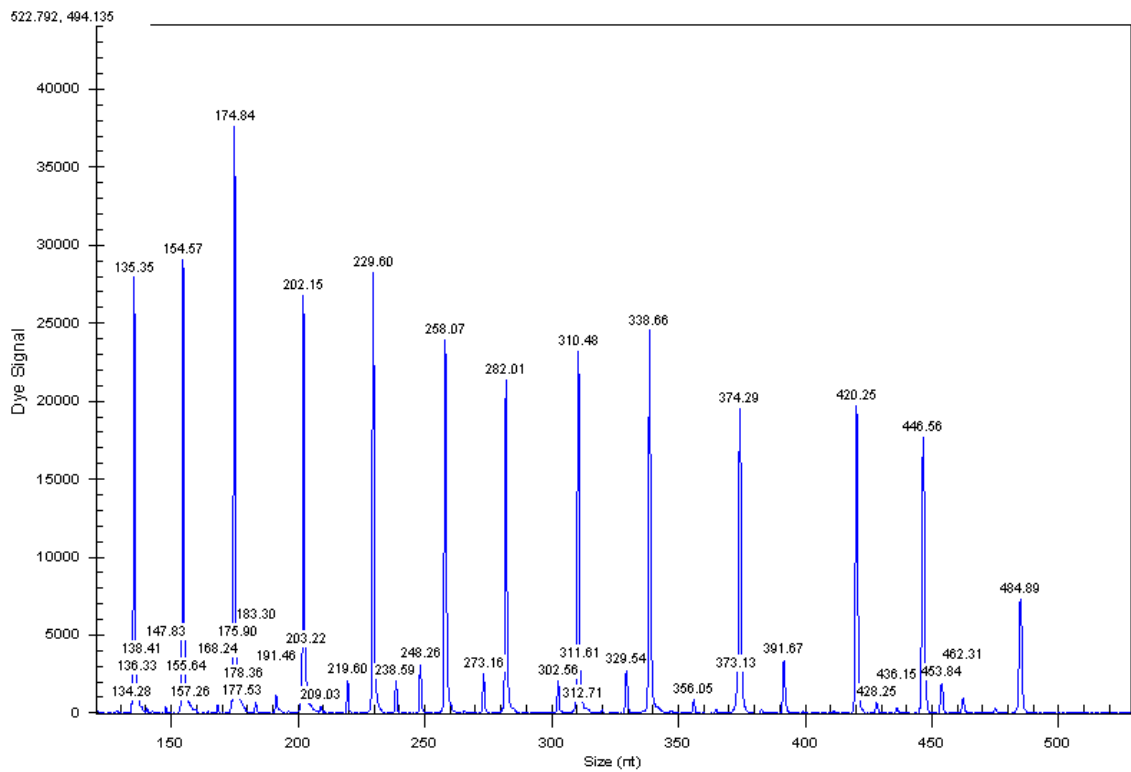
Şekil 4.4. Prostat kanser dokusunda *CDH13*, *WT1*, *GSTP1*, *ESR1*, *MSH6*, *RARβ* geninde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü (63 nolu hasta)



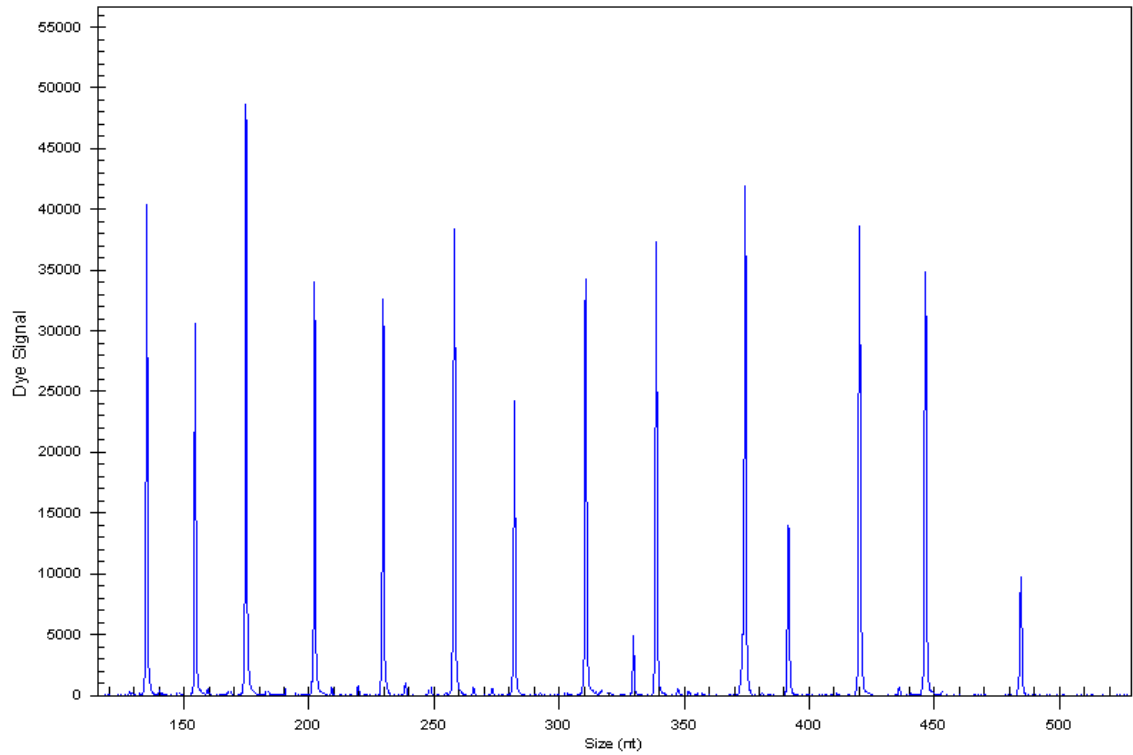
Şekil 4.5. Prostat kanser dokusunda *RARβ*, *CD44* geninde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü (49 nolu hasta)



Şekil 4.6. Prostat kanser dokusunda *TP73*, *RB1*, *MSH6* genlerinde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü (51 nolu hasta)



Şekil 4.7. Normal prostat dokusu (51 nolu örnek)



Şekil 4.8. Normal prostat dokusu (55 nolu örnek)

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi ile *MSH6* geninin metilasyon profili değerlendirildiğinde 31 (% 40.79) hastada metilasyon gözlenirken, 45 (% 59.21) hastada metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.4) (Tablolarda yalnızca sayılar verilmiş olup yüzdeler dosyadaki ek kısımlarda SPSS sonuçları halinde verilmiştir).

Tablo 4.4 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda *MSH6* metilasyon profili

<i>MSH6</i> metilasyon profili	Hasta sayısı (%)
Metile	31 (% 40.79)
Unmetile	45 (% 59.21)

MSH6 geninin metilasyon profilinin klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırılması Tablo 4.5’de gösterilmiştir.

Tablo 4.5 *MSH6* geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Klinikopatolojik parametreler	<i>MSH6</i> geni metilasyonu (n=76)		
	Metile (n=31) (% 40.79)	Unmetile (n=45) (% 59.21)	P değeri
Yaş			
≥65	10	15	0,922
<65	21	30	
Cinsiyet			
Kadın	0	0	
Erkek	31	45	
TNM sınıflaması			
T sınıflaması			
pT2	22	26	0,241
pT3 ve pT4	9	19	
N sınıflaması			
N0	0 (% 0)	0 (% 0)	
M sınıflaması			
M0	0 (% 0)	0 (% 0)	
Gleason Skoru			
< 7	13	13	0,239
≥ 7	18	32	

Tablo 4.5’deki bulgular incelendiğinde, *MSH6* geninde *metile profile* sahip 31 (% 40.79) hasta ve *MSH6* geninde *unmetile profile* sahip 45 (% 59.21) hasta saptanmıştır. *Yaşa göre bakıldığında*; <65 grubunda 21 (%27.63) hastanın, ≥65 grubunda ise 10 (% 13.16) hastanın *MSH6* geninde metile profil saptanmıştır. *Patolojik tümör sınıflandırmasına* göre, T sınıflamasında pT2 evresinde 22 (% 28.95) hasta, pT3 ve pT4 evresinde 9 (% 11.84) hastanın *MSH6* geninde metile profil belirlenmiştir. *Gleason skorlamasına* göre, Gleason skoru “< 7” olan 13 (% 17.11) hasta, Gleason skoru “≥7” olan 18 (% 23.68) hastanın *MSH6* geninde metile profil saptanmıştır. *MSH6* geni metilasyon profili ile klinikopatolojik parametreler (yaş, evre ve Gleason skor) arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır (p>0.05).

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi ile *RARβ* geninin metilasyon profili değerlendirildiğinde 26 (% 34.21) hastada metilasyon gözlenirken, 50 (% 65.79) hastada metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda *RARβ* metilasyon profili

<i>RARβ</i> metilasyon profili	Hasta sayısı (%)
Metile	26 (% 34.21)
Unmetile	53 (% 65.79)

RARβ geninin metilasyon profilinin klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırılması Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo 4.7 *RARβ* geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Klinikopatolojik parametreler	<i>RARβ</i> geni metilasyonu (n=76)		
	Metile (n=26) (% 34.21)	Unmetile (n=50) (% 65.79)	P değeri
Yaş			
≥ 65	13	12	0,022*
< 65	13	38	
Cinsiyet			
Kadın	0 (% 0)	0 (% 0)	
Erkek	26	50	
TNM sınıflaması			
T sınıflaması			
pT2	12	36	0,027*
pT3 ve pT4	14	14	
N sınıflaması			
N0	0 (% 0)	0 (% 0)	
M sınıflaması			
M0	0 (% 0)	0 (% 0)	
Gleason Skoru			
< 7	6	20	0,140
≥ 7	20	30	

Tablo 4.7’deki bulgular incelendiğinde, *RARβ* geninde metile profile sahip 26 (% 34.21) hasta ve *RARβ* geninde unmetile profile sahip 50 (% 65.79) hasta saptanmıştır. Yaşa göre bakıldığında; <65 grubunda 13 (% 17.11) hastanın, ≥65 grubunda ise 13 (% 17.11) hastanın *RARβ* geninde metile profil saptanmıştır. Patolojik tümör sınıflandırmasına göre, T sınıflamasında pT2 evresinde 12 (% 15.79) hastanın *RARβ* geninde metile profil belirlenken, pT3 ve pT4 evresinde 14 (% 18.42) hastanın *RARβ* geninde unmetile profil saptanmıştır. Gleason skorlamasına göre, Gleason skoru “< 7” olan 6 (% 7.89) hasta, Gleason skoru “≥7” olan 20 (% 26.32) hastanın *RARβ* geninde metile profil saptanmıştır. *RARβ* geni metilasyon profili ile klinikopatolojik parametrelerden “yaş” ve “evre” arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki

bulunmuşken ($p \leq 0.05$), *RARβ* geni ve Gleason skor arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır ($p > 0.05$).

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi ile *GSTP1* geninin metilasyon profili değerlendirildiğinde 24 (% 31.58) hastada metilasyon gözlenirken, 52 (% 68.42) hastada metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda *GSTP1* metilasyon profili

<i>GSTP1</i> metilasyon profili	Hasta sayısı (%)
Metile	24 (% 31.58)
Unmetile	52 (% 68.42)

GSTP1 geninin metilasyon profilinin klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırılması Tablo 4.9’de gösterilmiştir.

Tablo 4.9 *GSTP1* geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Klinikopatolojik parametreler	<i>GSTP1</i> geni metilasyonu (n=76)		P değeri
	Metile (n=24) (% 31.58)	Unmetile (n=52) (% 68.42)	
Yaş			
≥65	9	16	0,562
<65	15	36	
Cinsiyet			
Kadın	0 (% 0)	0 (% 0)	
Erkek	24	52	
TNM sınıflaması			
T sınıflaması			
pT2	13	35	0,270
pT3 ve pT4	11	17	
N sınıflaması			
N0	0 (% 0)	0 (% 0)	
M sınıflaması			
M0	0 (% 0)	0 (% 0)	
Gleason Skoru			
< 7	7	19	0,529
≥ 7	17	33	

Tablo 4.9’deki bulgular incelendiğinde, *GSTP1* geninde *metile profile* sahip 24 (% 31.58) hasta ve *GSTP1* geninde *unmetile profile* sahip 52 (% 68.42) hasta saptanmıştır. *Yaşa göre bakıldığında*; <65 grubunda 15 (%19.74) hastanın, ≥65 grubunda ise 9 (%

11.84) hastanın *GSTP1* geninde metile profil saptanmıştır. Patolojik tümör sınıflandırmasına göre, T sınıflamasında pT2 evresinde 13 (% 17.11) hastanın *GSTP1* geninde metile profil belirlenken, pT3 ve pT4 evresinde 11 (% 14.47) hastanın *GSTP1* geninde unmetile profil saptanmıştır. Gleason skorlamasına göre, Gleason skoru “< 7” olan 7 (% 8.75) hasta, Gleason skoru “≥7” olan 18 (% 22.37) hastanın *GSTP1* geninde metile profil saptanmıştır. *GSTP1* geni metilasyon profili ile klinikopatolojik parametreler (yaş, evre ve Gleason skor) arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır (p>0.05).

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi ile CDH13 geninin metilasyon profili değerlendirildiğinde 18 (% 23.68) hastada metilasyon gözlenirken, 58 (% 76.32) hastada metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.10 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda *CDH13* metilasyon profili

<i>CDH13</i> metilasyon profili	Hasta sayısı (%)
Metile	18 (% 23.68)
Unmetile	58 (% 76.32)

CDH13 geninin metilasyon profilinin klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırılması Tablo 4.11’de gösterilmiştir.

Tablo 4.11’deki bulgular incelendiğinde, *CDH13* geninde metile profile sahip 18 (% 23.68) hasta ve *CDH13* geninde unmetile profile sahip 58 (% 76.32) hasta saptanmıştır. Yaşa göre bakıldığında; <65 grubunda 10 (% 13.16) hastanın, ≥65 grubunda ise 8 (% 10.53) hastanın *CDH13* geninde metile profil saptanmıştır. Patolojik tümör sınıflandırmasına göre, T sınıflamasında pT2 evresinde 8 (% 10.53) hastanın *CDH13* geninde metile profil belirlenken, pT3 ve pT4 evresinde 10 (% 13.16) hastanın *CDH13* geninde unmetile profil saptanmıştır. Gleason skorlamasına göre, Gleason skoru “<7” olan 4 (% 5.26) hasta, Gleason skoru “≥7” olan 14 (% 18.42) hastanın *CDH13* geninde metile profil saptanmıştır. *CDH13* geni metilasyon profili ile klinikopatolojik parametreler (yaş, evre ve Gleason skor) arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır (p>0.05).

Tablo 4.11 *CDH13* geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Klinikopatolojik parametreler	<i>CDH13</i> geni metilasyonu (n=76)		
	Metile (n=18) (% 23.68)	Unmetile (n=58) (% 76.32)	P değeri
Yaş			
≥65	8	17	0,233
<65	10	41	
Cinsiyet			
Kadın	0 (% 0)	0 (% 0)	
Erkek	18	58	
TNM sınıflaması			
T sınıflaması			
pT2	8	40	0,060
pT3 ve pT4	10	18	
N sınıflaması			
N0	0 (% 0)	0	
M sınıflaması			
M0	0 (% 0)	0	
Gleason Skoru			
< 7	4	22	0,220
≥ 7	14	36	

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi ile *TP73* geninin metilasyon profili değerlendirildiğinde 18 (% 23.68) hastada metilasyon gözlenirken, 58 (% 76.32) hastada metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.12).

Tablo 4.12 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda *TP73* metilasyon profili

<i>TP73</i> metilasyon profili	Hasta sayısı (%)
Metile	18 (% 23.68)
Unmetile	58 (% 76.32)

TP73 geninin metilasyon profilinin klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırılması Tablo 4.13'de gösterilmiştir.

Tablo 4.13 *TP73* geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Klinikopatolojik parametreler	<i>TP73</i> geni metilasyonu (n=76)		
	Metile (n=18) (% 23.68)	Unmetile (n=58) (% 76.32)	P değeri
Yaş			
≥65	7	18	0,536
<65	11	40	
Cinsiyet			
Kadın	0 (% 0)	0 (% 0)	
Erkek	18	58	
TNM sınıflaması			
T sınıflaması			
pT2	9	39	0,185
pT3 ve pT4	9	19	
N sınıflaması			
N0	0 (% 0)	0 (% 0)	
M sınıflaması			
M0	0 (% 0)	0 (% 0)	
Gleason Skoru			
< 7	5	21	0,510
≥ 7	13	37	

Tablo 4.13'deki bulgular incelendiğinde, *TP73* geninde metile profile sahip 18 (% 23.68) hasta ve *TP73* geninde unmetile profile sahip 58 (% 76.32) hasta saptanmıştır. Yaşa göre bakıldığında; <65 grubunda 11 (%14.47) hastanın, ≥65 grubunda ise 7 (% 9.21) hastanın *TP73* geninde metile profil saptanmıştır. Patolojik tümör sınıflandırmasına göre, T sınıflamasında pT2 evresinde 9 (% 11.84) hastanın *TP73* geninde metile profil belirlenken, pT3 ve pT4 evresinde 9 (% 11.84) hastanın *TP73* geninde unmetile profil saptanmıştır. Gleason skorlamasına göre, Gleason skoru “<7” olan 5 (% 6.58) hasta, Gleason skoru “≥7” olan 13 (% 17.10) hastanın *TP73* geninde metile profil saptanmıştır. *TP73* geni metilasyon profili ile klinikopatolojik parametreler (yaş, evre ve Gleason skor) arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır (p>0.05).

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi ile CD44 geninin metilasyon profili değerlendirildiğinde 14 (% 18.42) hastada metilasyon gözlenirken, 62 (% 81.58) hastada metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.14).

Tablo 4.14 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda *CD44* metilasyon profili

<i>CD44</i> metilasyon profili	Hasta sayısı (%)
Metile	14 (% 18.42)
Unmetile	62 (% 81.58)

CD44 geninin metilasyon profilinin klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırılması Tablo 4.15’de gösterilmiştir.

Tablo 4.15. *CD44* geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Klinikopatolojik parametreler	<i>CD44</i> geni metilasyonu (n=76)		
	Metile (n=14) (% 18.42)	Unmetile (n=62) (% 81.58)	P değeri
Yaş			
≥65	5	20	0,804
<65	9	42	
Cinsiyet			
Kadın	0 (% 0)	0 (% 0)	
Erkek	14	62	
TNM sınıflaması			
T sınıflaması			
pT2	6	42	0,081
pT3 ve pT4	8	20	
N sınıflaması			
N0	0 (% 0)	0 (% 0)	
M sınıflaması			
M0	0 (% 0)	0 (% 0)	
Gleason Skoru			
< 7	5	21	0,896
≥ 7	9	41	

Tablo 4.15’deki bulgular incelendiğinde, *CD44* geninde *metile profile* sahip 14 (% 18.42) hasta ve *CD44* geninde *unmetile profile* sahip 62 (% 81.58) hasta saptanmıştır. *Yaşa göre bakıldığında*; <65 grubunda 9 (% 11.84) hastanın, ≥65 grubunda ise 5 (% 6.58) hastanın *CD44* geninde metile profil saptanmıştır. *Patolojik tümör sınıflandırmasına* göre, T sınıflamasında pT2 evresinde 6 (% 7.89) hastanın *CD44* geninde metile profil belirlenken, pT3 ve pT4 evresinde 8 (% 10.53) hastanın *CD44* geninde unmetile profil saptanmıştır. *Gleason skorlamasına* göre, Gleason skoru “<7” olan 5 (% 6.58) hasta, Gleason skoru “≥7” olan 9 (% 11.84) hastanın *CD44* geninde metile profil saptanmıştır. *CD44* geni metilasyon profili ile klinikopatolojik

parametreler (yaş, evre ve Gleason skor) arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır ($p>0.05$).

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi ile ESR1 geninin metilasyon profili değerlendirildiğinde 13 (% 17.11) hastada metilasyon gözlenirken, 63 (% 82.89) hastada metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.16).

Tablo 4.16 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda ESR1 metilasyon profili

<u>ESR1 metilasyon profili</u>	Hasta sayısı (%)
Metile	13 (% 17.11)
Unmetile	63 (% 82.89)

ESR1 geninin metilasyon profilinin klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırılması Tablo 4.17’de gösterilmiştir.

Tablo 4.17 ESR1 geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

<u>Klinikopatolojik parametreler</u>	<u>ESR1 geni metilasyonu (n=76)</u>		
	<u>Metile (n=13) (% 17.11)</u>	<u>Unmetile (n=63) (% 82.89)</u>	<u>P değeri</u>
<u>Yaş</u>			
≥65	4	21	0,858
<65	9	42	
<u>Cinsiyet</u>			
Kadın	0 (% 0)	0 (% 0)	
Erkek	13	63	
<u>TNM sınıflaması</u>			
<u>T sınıflaması</u>			
pT2	6	42	0,163
pT3 ve pT4	7	21	
<u>N sınıflaması</u>			
N0	0 (% 0)	0 (% 0)	
<u>M sınıflaması</u>			
M0	0 (% 0)	0 (% 0)	
<u>Gleason Skoru</u>			
< 7	1	25	0,027*
≥ 7	12	38	

Tablo 4.17’deki bulgular incelendiğinde, ESR1 geninde metile profile sahip 13 (% 17.11) hasta ve ESR1 geninde unmetile profile sahip 63 (% 82.89) hasta saptanmıştır.

Yaşa göre bakıldığında; <65 grubunda 9 (% 11.84) hastanın, ≥65 grubunda ise 4 (% 5.26) hastanın *ESR1* geninde metile profil saptanmıştır. Patolojik tümör sınıflandırmasına göre, T sınıflamasında pT2 evresinde 6 (% 7.89) hastanın *ESR1* geninde metile profil belirlenken, pT3 ve pT4 evresinde 7 (% 9.21) hastanın *ESR1* geninde unmetile profil saptanmıştır. Gleason skorlamasına göre, Gleason skoru “<7” olan 1 (% 1.32) hasta, Gleason skoru “≥7” olan 12 (% 15.79) hastanın *ESR1* geninde metile profil saptanmıştır. *ESR1* geni metilasyon profili ile klinikopatolojik parametrelerden yaş ve evre arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamışken ($p>0.05$), *ESR1* geni ve Gleason Skor arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmuştur ($p\leq 0.05$).

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi ile *WT1* geninin metilasyon profili değerlendirildiğinde 13 (% 17.11) hastada metilasyon gözlenirken, 63 (% 82.89) hastada metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.18).

Tablo 4.18 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda *WT1* metilasyon profili

<i>WT1</i> metilasyon profili	Hasta sayısı (%)
Metile	13 (% 17.11)
Unmetile	63 (% 82.89)

WT1 geninin metilasyon profilinin klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırılması Tablo 4.19’da gösterilmiştir.

Tablo 4.19’deki bulgular incelendiğinde, *WT1* geninde metile profile sahip 13 (% 17.11) hasta ve *WT1* geninde unmetile profile sahip 63 (% 82.89) hasta saptanmıştır. Yaşa göre bakıldığında; <65 grubunda 10 (% 13.16) hastanın, ≥65 grubunda ise 3 (% 3.95) hastanın *WT1* geninde metile profil saptanmıştır. Patolojik tümör sınıflandırmasına göre, T sınıflamasında pT2 evresinde 7 (% 9.21) hastanın *WT1* geninde metile profil belirlenken, pT3 ve pT4 evresinde 6 (% 7.89) hastanın *WT1* geninde unmetile profil saptanmıştır. Gleason skorlamasına göre, Gleason skoru “<7” olan 3 (% 3.95) hasta, Gleason skoru “≥7” olan 10 (% 13.16) hastanın *WT1* geninde metile profil saptanmıştır. *WT1* geni metilasyon profili ile klinikopatolojik parametreler (yaş, evre ve Gleason skor) arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.19 *WT1* geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Klinikopatolojik parametreler	<i>WT1</i> geni metilasyonu (n=76)		
	Metile (n=13) (% 17.11)	Unmetile (n=63) (% 82.89)	P değeri
Yaş			
≥65	3	22	0,408
<65	10	41	
Cinsiyet			
Kadın	0 (% 0)	0 (% 0)	
Erkek	13	63	
TNM sınıflaması			
T sınıflaması			
pT2	7	41	0,445
pT3 ve pT4	6	22	
N sınıflaması			
N0	0 (% 0)	0 (% 0)	
M sınıflaması			
M0	0 (% 0)	0 (% 0)	
Gleason Skoru			
< 7	3	23	0,353
≥ 7	10	40	

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi ile *RBI* geninin metilasyon profili değerlendirildiğinde 11 (% 14.47) hastada metilasyon gözlenirken, 65 (% 85.53) hastada metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.20).

Tablo 4.20 Prostat kanser tanısı almış 76 olguda *RBI* metilasyon profili

<i>RBI</i> metilasyon profili	Hasta sayısı (%)
Metile	11 (% 14.47)
Unmetile	65 (% 85.53)

RBI geninin metilasyon profilinin klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırılması Tablo 4.21’de gösterilmiştir.

Tablo 4.21. *RBI* geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Klinikopatolojik parametreler	<i>RBI</i> geni metilasyonu (n=76)		
	Metile (n=11) (% 14.47)	Unmetile (n=65) (% 85.53)	P değeri
Yaş			
≥65	5	20	0,338
<65	6	45	
Cinsiyet			
Kadın	0 (% 0)	0 (% 0)	
Erkek	11	46	
TNM sınıflaması			
T sınıflaması			
pT2	10	38	0,039*
pT3 ve Pt4	1	27	
N sınıflaması			
N0	0 (% 0)	0 (% 0)	
M sınıflaması			
M0	0 (% 0)	0 (% 0)	
Gleason Skoru			
< 7	5	21	0,395
≥ 7	6	44	

Tablo 4.21'deki bulgular incelendiğinde, *RBI* geninde *metile profile* sahip 11 (% 14.47) hasta ve *RBI* geninde *unmetile profile* sahip 65 (% 85.53) hasta saptanmıştır. *Yaşa göre bakıldığında*; <65 grubunda 5 (% 6.58) hastanın, ≥65 grubunda ise 6 (% 7.89) hastanın *RBI* geninde metile profil saptanmıştır. *Patolojik tümör sınıflandırmasına* göre, T sınıflamasında pT2 evresinde 10 (% 13.15) hastanın *RBI* geninde metile profil belirlenken, pT3 ve pT4 evresinde 1 (% 1.32) hastanın *RBI* geninde unmetile profil saptanmıştır. *Gleason skorlamasına* göre, Gleason skoru “<7” olan 5 (% 6.58) hasta, Gleason skoru “≥7” olan 6 (% 7.89) hastanın *RBI* geninde metile profil saptanmıştır. *RBI* geni metilasyon profili ile klinikopatolojik parametrelerden yaş ve Gleason skor arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamışken ($p>0.05$), *RBI* geni metilasyon durumu ile evre arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmuştur ($p\leq 0.05$).

5. TARTIŞMA

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda, histopatolojik olarak incelenen "Ürotelyal karsinom" tanısı almış 80 olgu çalışmaya alınmıştır. Çalışmada, olgulara ait % 10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş, parafin bloklara gömülü (FFPE) doku örnekleri kullanılmıştır. Tüm olgulardan tümör dokusunu en iyi yansıtan, içinde nekroz, kanama, inflamatuvar hücre ve stromal elemanların en az olduğu alanları içeren kesitler belirlenerek, bu kesitlere ait parafin bloklardan genomik DNA izolasyonu için 10 mikron kalınlığında ardışık seri kesitler alınmıştır. Hematoksilen-eozin ile boyanmış arşiv preparatları, yeniden WHO/ISUP 2004 sınıflaması kriterlerine göre gradelendirilmiş ve 2004 TNM sınıflamasına göre evrelendirilmiştir. Olguların yaşları, cinsiyetleri, biyopsi şekli, takip aralıkları, hastalara ait patoloji raporları, hasta dosyalarından temin edilmiştir.

Elde edilen DNA örnekleri metilasyon spesifik MLPA yöntemiyle, tanımlanmış tümör baskılayıcı genlere yönelik hazırlanmış ME002-B1 probmiksiyle çalışılmış, incelen prob bölgelerindeki metilasyon profilleri araştırılmıştır.

Kanser yalnız kontrolsüz hücre çoğalması gibi görünse de, sebeplerine baktığımızda onkogen aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin ise inaktivasyonu ve DNA tamir mekanizmasının devre dışı kalması sonucu kontrolden çıkan hücre bölünmesi sürecidir. Yani oluşumu için birkaç şartın bir araya geldiği çok basamaklı bir hastalıktır. Bu genlerde oluşacak değişimler sonuç olarak hücre çoğalmasının temel basamağını etkilediği için kanser oluşumuyla doğrudan ilişkilidir. Genlerin değişimi; mutasyonlar gibi genetik olabildiği gibi metilasyon veya histon modifikasyonları gibi epigenetik değişimler de olabilmektedir.

Hücre bölünmesinde söz sahibi olan genlerden onkogenler; hücre bölünme sürecini hızlandırırken, tümör baskılayıcı genler ise tam aksi yönde işlev sahibi olarak normal koşullarda hücre çoğalmasını baskılamaktadır. Ancak meydana gelebilecek herhangi bir değişim bu genlerin işlevini de etkileyerek hücre döngüsü ve çoğalmasındaki kontrolünü ortadan kaldıracaktır.

Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelebilecek ve işlevini bozabilecek değişimleri genetik ve epigenetik değişimler olmak üzere 2 alt sınıfta toplayabiliriz. Genetik değişimler, mutasyon, delesyon gibi genin yapısında bozulmalarla ortaya çıkan ve kalıtılabilen özelliklerdir. Genin yapısı ve bunun yanında işlevini de etkilemektedir. Epigenetik değişimler ise yapısal olarak kalıtılabilen değişimler olmadığı halde genin işlevini etkileyebilmektedir. Bu değişimler DNA dizi yapısı değişikliğiyle tanımlanamadığı gibi geri dönüşümlü de olabildiği için kanser prognozu ardından tedavisi için de kullanılacak önemli bir basamak olabileceği düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan birçok kanser çalışması ve bu çalışmada da metile olmuş genlerin kanser mekanizması ve geri dönüşümü hakkında daha çok bilgi sahibi olabilmek ve bu sayede tedavi için yeni bir basamak oluşturabilmek amaçlanmaktadır.

Epigenetik mekanizmaları;

- 1) DNA metilasyonu,
- 2) Histon modifikasyonları olarak sınıflayabiliriz.

DNA metilasyonları DNMT enzimleriyle CpG adacıklarında sitozinin 5 numaralı karbonuna metil grubu eklenmesidir. Yüksek ökaryotların genomlarında transkripsiyonun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Bogdanovic ve Veenstra 2009, Chen vd 2011). DNA metillenmesi yapısında bazı değişikliklere yol açarak metil için CpG bölgesinde bağlanma bölgesi oluşturmaktadır. Bu bölgelere metil-CpG bağlanma domaini (MBD) ile bağlanan pekçok transkripsiyon represörü bulunmaktadır. Bu da transkripsiyon baskılanmasında metilasyonun yerini göstermektedir.

Bu çalışmamızda 76 PCa tanılı hastadan (80 hasta ile başlanmıştı) izole edilen DNA örneklerinin MS- MLPA yöntemi ile belirlenmiş tümör baskılayıcı genlerindeki mutasyon seviyeleri ölçülmüştür. Başlangıçta 80 hasta çalışmaya alınmış olmasına

rağmen 4 hastanın örnekleri çalışmaya dahil edilememiştir. Bunun sebebi ise hastaların klinikopatolojik verilerine (yaş, klinik evre) ulaşılammış olmasıdır.

Prostat kanser tanısı almış 80 olgu ait formalinle fiske edilmiş parafine gömülü prostat dokularından elde edilen DNA'lar MLPA prob seti (ME002-B1 tumor supressor probe mix, MRC, Hollanda) kullanılarak, *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *TP53*, *PTEN*, *MGMT*, *PAX5*, *CDH13*, *TP73*, *WT1*, *VHL*, *GSTP1*, *CHFR*, *ESR1*, *RBI*, *MSH6*, *THBS1*, *CADMI*, *STK11*, *PYCARD*, *PAX6*, *CDKN2A*, *GATA5*, *RARβ*, *CD44* olmak üzere toplam 25 tümör baskılayıcı genin promotör hipermetilasyonu Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi ile analiz edilmiştir. Aynı zamanda, 25 tümör baskılayıcı genin promotör hipermetilasyonu ile klinikopatolojik parametreler (yaş, cinsiyet, grade, TNM sınıflaması (evre), kas invazyonu) karşılaştırılmıştır. Hipermetilasyon sıklıkları; *BRCA1* için % 1,32, *BRCA2* için % 0, *ATM* için % 3,95, *TP53* için % 7.89, *PTEN* için % 1.32, *MGMT* için % 2,63, *PAX5* için % 0, *CDH13* için % 23,68 *TP73* için % 23,68 *WT1* için % 17,11, *VHL* için % 0, *GSTP1* için % 31,57, *CHFR* için % 0, *ESR1* için % 17,10 *RBI* için % 14,47, *MSH6* için % 40,79, *THBS1* için % 3,95, *CADMI* için % 0, *STK11* için % 0, *PYCARD* için % 1,32, *PAX6* için % 1,32, *CDKN2A* için % 0, *GATA5* için % 0, *RARβ* için % 34,21 *CD44* için % 18,42 olarak tespit edilmiştir. *MSH6*, *RARβ*, *GSTP1* en yüksek metillenen genler olarak saptanmıştır.

Son zamanlardaki moleküler biyoloji teknikleri bize kanserdeki transkripsiyonel susturmayla bağlantılı regülatör bölgelerinde(promotor bölgeler) DNA metilasyonu gibi epigenetik değişimler hakkında bilgi vermektedir. Prostat kanseri için olası hedefin promotör bölgedeki genlerin hipermetilasyon yolağı olabileceği düşünülmektedir. Prostat kanseri gelişim süreci ve gelişimi ile bağlantılı 40'dan fazla genin metilasyon durumu araştırıldı (Mihi Yang ve Jong Y. Park 2013). Bu genler DNA onarım, metabolizma, invazyon ve metastaz gibi önemli yolaklardaydı. Bulgular patogenezis hakkında ve prostat kanseri kişisel tedavi oluşturabilme hakkında yeni fikirler ortaya koymaktadır.

Genetik ve epigenetik değişimlerin sürekliliği sonucunda prostat kanser oluşumu gözlenmektedir. Genetik değişimler her ne kadar önemli anti kanser fonksiyonlu (tümör baskılayıcı ve DNA tamir genleri) genlerin inaktivasyonunu içerse de promotör bölgede DNA metilasyonu da bu genlerin ekspresyonunun susturulmasında önemli bir mekanizmadır. Tümör baskılayıcı genlerin promotör bölelerindeki DNA metilasyonu

karsinogenezisin erken aşamasında çeşitli frekanslarda meydana gelmektedir. Prostat kanseri, DNA metilasyonu, imprinting kaybı ve histon modifikasyonlarını içeren birkaç çeşit epigenetik değişiklik içermektedir.

CpG adaları CpG bölgeleri açısından zengin, 200 baz çiftlik (bp) birkaç kilobaz arası değişebilen uzunlukta, genellikle yüksek eksprese edilebilen genlerin promotor bölgelerinin yanında lokalize olmuş ve prostat kanseri de dahil insan tümörlerinde yaygın metilasyon içeren bölgedir. Tümör oluşumunun genel özelliği CpG'deki 5. sitozinden metile olmasıdır. Promotor bölge CpG adalarında gözlemlenen hipermetilasyon değişimleri gen susturulmasıyla sonuçlanarak tümöre yol açtığı gözlemlenmektedir.

Lisette Delgado Cruzata vd 2012'de yapmış olduğu prostat kanserinde DNA metilasyon çalışmasında Gleason skor ve derecelendirmesine göre DNA metilasyonunun değişimine bakılmıştır. Bu çalışmada tek vaka yerine birkaç vaka seri halde çalışılmıştır. Kontrol çalışması histolojik olarak II/III derecelerden oluşan örneklerle Columbia University Medical Center'dan alınan örnekler karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın amacı DNA metilasyon seviyesinin uygun PCa tümör dokusu biyomarkeri olup olmadığı ve bu biyomarkerlerin klinikopatolojik olarak daha kötü tümör karakteristiğine uygun değişip değişmediğini araştırmaktır. 24 çift prostat tümör dokusu ve çevre dokusundan alınan örneklerdeki p16(CDKN4A), APC, GSTP1 ve LINE-1 metilasyon seviyeleri kantitatif pyrosekans ile tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra 27 PCa hastası ve 24 kontrol hastasının plazma örnekleri de araştırıldı. DNA metilasyon seviyesi çevresel tümörsüz dokuya kıyasla tümör dokularında daha yüksekti. Bunların içinde GSTP1 %38,9 , p16%5,9 , APC % 14,5 olarak bulunmuştur. P16, APC ve GSTP1 seviyeleri Gleason >7 olanlarda diğerlerine göre daha yüksekti. GSTP1 ve LINE-1 metilasyonu için plazmada korelasyon göstermektedir. Bu bilgiler başlangıç olsa da DNA metilasyonunun klinik olarak agresif PCa hastalarında biyomarker olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Paul Cairns, Manel Esteller ve arkadaşları tarafından 2001'de yapılan hipermetilasyon çalışmasında (radikal prostatektomi hastalarından elde edilen tümör örnekleri patolojik görüş alındıktan sonra formalin fikse edilmiş bloklardan, neoplastik

açından yoğun bölgelerden alınmıştır. 28 hastanın 22'sinde %79'unda GSTP1 pozitif. 6 hastada ise GSTP1 açısından metilasyon gözlenmemiştir.

Daniel Jacobs, Yingying Mao ve arkadaşları tarafından yapılan prostat kanser metilasyon çalışmasında 12 çift prostat tümör dokusu ve çevre dokudan elde edilen 56 gen ve promotor bölgesinde 396 CpG bölgesi metilasyonu analiz edilmiştir. Metilasyonun 52 bölgede anlamlı olarak arttığı 17 alanda ise anlamlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. WT1 hipermetilasyonu kantitatif DNA metilasyon analizi kullanılarak doğrulanmıştır.

Lorenzo Richiardi ve arkadaşları ile yerel olarak yapılan bir çalışmada da İtalya'nın Torino şehrinde prostat kanserli hastalardan oluşan 2 grup üzerinde çalışılmıştır. Seçilen 157 hasta ile neoplastik olmayan prostat dokuları 14 yıl boyunca takip edildi. Parafine gömülü prostat tümör örneklerindeki çevre dokudan DNA elde edildi. Real-time PCR kullanılarak GSTP1 ve APC izole edildi. Sonuç olarak da %40-45 oranında APC ve GSTP1 metilasyonu saptandı.

Maruyama ve arkadaşları 2002'de yaptıkları bir çalışmada prostat kanseri metilasyon profilinde değişimleri ve bunun klinik bulgularıyla karşılaştırmasını yapmışlardır. Bu amaçla 101 prostat kanser doku örneklerini ve 32 malignant olmayan prostat doku örneklerini içeren çalışmalarında, farklı genlerin promotor hipermetilasyonunu araştırmışlardır. Araştırılan genler ve metilasyon yüzdeleri sırasıyla RARbeta, % 53; RASSF1A, % 53; GSTP1, % 36; CDH13, % 31; APC, % 27; CDH1, % 27; FHIT, % 15; p16(INK4A), % 3 ve DAPK, % 1 olarak belirlemişlerdir. Malign olmayan dokularda aynı genlerdeki metilasyon yüzdesi daha düşük bulunmuştur. Araştırmacılar olguları serum PSA seviyesi düşük ve yüksek (sınır değer 8ng/ml) olmak üzere 2 gruba ayırdıklarında, PSA seviyesi ve metilasyon indeksi arasında sıkı bir korelasyon olduğunu gözlemlemişlerdir. Kopya sayısı farklı ve metilasyonları farklı olan 37 tümör baskılayıcı gen kemik iliğinden, 30 tümör baskılayıcı gen kandan elde edildi (91 hastanın 13'ünde çok az miktarda DNA elde edilebildi). Değişikliğe uğramış tümör baskılayıcı genlerin kopya sayısı % 28 ile % 37 arasındaydı. Kemik iliğinde en çok değişiklik APC, CHFR, TP73 ve GSTP1 genlerinde gözlemlendi. İstatistiksel analizler TP73'ün kopya sayısı ile prostat sınırını pozitif çıkardı. Hem MS-MLPA hem de sodyum bisüfit tekniği tüm genlerin metillenmediğini gösterdi (Maruyama vd 2002).

Schwarzenbach ve arkadaşları tarafından 2011'de yapılan bir araştırmada tümör bağı hücre- serbest DNA örneği tanımlamasını kan ve kemik iliğinde devam ettirmek için hızlı bir yöntem olan metilasyon spesifik multipleks ligasyon bağımlı amplifikasyon (MS-MLPA) tekniği kullanılmıştır. MS-MLPA, 37 tümör supresör genin bir reaksiyon içerisinde genetik ve epigenetik değişimini saptayabilir. Çünkü tek gen analiziyle vakit kaybetmemektedir. MLPA'nın doğruluğuna bakmak için 91 prostat kanseri hastasının kan ve kemik iliği örneğine bakıldı. Sodyum bisülfid DNA sekansı ile tek reaksiyonu araştırmak için referans olarak 4 gen kullanıldı (CD44, E-Kaderin, CDKN2a ve PTEN). Kopya sayısı farklı ve metilasyonları farklı olan 37 tümör baskılayıcı gen kemik iliğinden, 30 tümör baskılayıcı gen kandan elde edildi (91 hastanın 13'ünde çok az miktarda DNA elde edilebildi). Değişikliğe uğramış tümör baskılayıcı genlerin kopya sayısı % 28 ile % 37 arasındaydı. Kemik iliğinde en çok değişiklik APC, CHFR, TP73 ve GSTP1 genlerinde gözlemlendi. İstatistiksel analizler TP73'ün kopya sayısı ile prostat sınırını pozitif çıkardı. Hem MS-MLPA hem de sodyum bisülfid tekniği tüm genlerin metillenmediğini gösterdi. bu çalışmadaki sonuçlar, her kanser hastasının tümör biyolojisi hakkında bilgi edinmeyi sağlanabilecek non invaziv yeni bir yöntem olarak MS-MLPA'nın hücreden bağımsız plazma DNA içerisindeki tümör baskılayıcı genlerinde çoklu kompleks belirlenmesindeki olası kısıtlamaları göstermiş oldu (Schwarzenbach vd 2011).

Yine 2011 yılında ALBANY ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada bu bulgular desteklenmiş CpG adalarının hipermetilasyonunun prostat hücrelerinin neoplastik hale dönüşümünde yaygın şekilde gözlemlendiği bildirilmiştir. Histon modifikasyonu gen transkripsiyon seviyesi ve kromozom yapısındaki değişimler tümör gen fonksiyonunda değişime yol açmaktadır. Bu epigenetik sapmaların geri dönüşümlü ve tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonunun yeniden yapılanabilir olması, onları, prostat kanseri tedavisinde cazip hedefler haline getirmektedir (DNA demetilasyonu ve engellenen histon deasetilasyonu yoluyla) (ALBANY vd 2011).

Yapılan birçok çalışmada, eşey hücreleriyle kalıtılan ilk mutasyonun ardından ikinci allelin susturulmasındaki en önemli mekanizmalardan birinin metilasyon olduğu görülmüştür. Yani, mutasyonlu allelin promoter bölgesinde herhangi bir değişiklik meydana gelmezken; sağlam allelde metilasyon sonucu inaktivasyon meydana gelmiştir.

Promoter bölge hipermetilasyonuna bağı olarak susturulan ve böylece kansere neden olan aday tümör baskılayıcı genlerin listesi gün geçtikçe uzamaktadır.

Bu çalışmada, prostat kanseri hastalarında, MLPA tekniğini kullanarak tümör baskılayıcı genlerin metilasyonlarını belirlemeyi ve bunun kanser ile ilişkisini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla Pamukkale Üniversitesi Patoloji Bölümü'nde prostat tanısı konmuş olan 80 olguya ait parafin bloklara gömülü doku örneklerinden DNA izolasyonu ve MLPA yöntemi kullanılarak da bu örneklerin metilasyon paternlerinin saptanması amaçlanmıştır. Ancak klinikopatolojik verilerin olmaması sebebiyle 76 olgu ile sonuçlanmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Ülkemizde MLPA tekniği kullanılarak prostat kanseri metilasyonu hakkında yapılan çalışma olmamasından dolayı, yapacağımız bu çalışmayla literatüre katkı sağlama, hastalığın belirlenmesi, erken tanıya olanak sağlaması ve doğru tedavinin uygulanabilmesine katkıda bulunması amaçlanmaktadır.

Yaptığımız çalışmada saptadığımız tespit edilen *TP53*, *PTEN*, *PAX5*, *CDH13*, *TP73*, *WT1*, *ESR*, *RBI*, *MSH6*, *CADM1*, *GATA5*, *RARβ*, *CD44* tümör baskılayıcı genlerin promotör hipermetilasyonları arasında *CDH13*, *WT1*, *RBI*, *MSH6* yüksek oranlarda metillenen genlerin hipermetilasyon durumlarıyla, klinikopatolojik verileri karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamasının sebebi, incelediğimiz metilasyon paternlerinin fazla sayıda değişken ile karşılaştırılması ve ayrıca karşılaştırılan değişkenlerin tespit edildiği hasta sayısının azlığından dolayı istatistiksel olarak sağlıklı verilere ulaşamamıştır. Doğru, anlamlı istatistiksel bir sonuç elde etmek için böyle çalışmalarda incelenen vaka sayısını artırmak gereklidir.

6. SONUÇ

Kanser gelişiminde ve ilerlemesinde epigenetik mekanizmalar önemlidir. CpG adalarının hipermetilasyonu, transkripsiyonal sessizleşmede ve tümör baskılayıcı genlerin düzenlenmesinde kritik rol oynar. DNA metilasyonu insan kanserlerinde en çok çalışılan epigenetik mekanizmadır. Tümörle ilişkili genlerin promotöründeki CpG adalarının DNA hipermetilasyonu ve bunların sonucu susturulma kanserde yaygın bir epigenetik anormalliktir ve hastalık aktivitesinin bir belirtecinin yanı sıra yeni kanserle ilişkili genleri klonlamak için yararlı bir belirteç olarak hizmet verebilir.

Kanserle ilişkili genlerin anormal promotör metilasyonunun tespiti, prostat kanseri dahil tanısı, prognozu veya tümörlerin metastatik potansiyelinin tespiti için gerekli olabilir. Kanser gelişiminde, özellikle tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu erken evrede gözlenmesi, hipermetilasyonun erken tanı için önemli bir marker olabilir.

Bu amaçla gerçekleştirilen araştırmanın sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada, Prostat kanser tanısı almış 80 prostat kanseri dokusuna ait parafin blok örnekleri ile 25 tümör baskılayıcı genin metilasyon durumu MS-MLPA (metilasyon spesifik-multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu) analizi ile değerlendirilmiştir. Prostat kanseri doku örneklerinde en sık metillenen genlerin *MSH6*, *RARβ*, *GSTP1*, *CDH13*, *TP73*, *CD44*, *ESR1*, *WT1* ve *RBI* olarak belirlenmiştir. Prostat tümöründe en çok gözlediğimiz metilasyon miktarları *MSH6* (%40,79), *RARβ* (%34,21), *GSTP1* (%31,58), *CDH13* (%23,68), *TP73* (%23,68), *CD44* (%18,42), *ESR1* (%17,11), *WT1* (%17,11) ve *RBI*(%14,47) olarak tespit edilmiştir. Diğer tümör baskılayıcı genlerin metilasyonu *BRCA1* (% 1,32), *BRCA2* (% 0), *ATM* (%3,95), *TP53* (% 7,89), *PTEN* (%1,32), *MGMT* (% 2,63), *PAX5* (% 0), *TP73* (% 23,68), *VHL* (% 0), *CHFR* (% 0), *THBS1* (% 3,95), *CADM1* (% 0), *STK11* (% 0), *PYCARD* (% 1,32), *PAX6* (% 1,32), *CDKN2A* (% 0), *GATA5* (% 0) olarak belirlenmiştir.

* Prostat kanser tanısı almış 76 olgunun % 32,89'unun 65 yaş üzerinde olduğu ve bunların % 40'ında *MSH6* geninde metilasyon saptanırken, % 60'ında metilasyon gözlenmemiştir.

* Prostat kanser tanısı almış 76 olgunun % 32,89'unun 65 yaş üzerinde olduğu ve bunların % 52'inde *RARβ* geninde metilasyon saptanırken, % 48'inde metilasyon gözlenmemiştir.

* Prostat kanser tanısı almış 76 olgunun % 32,89'unun 65 yaş üzerinde olduğu ve bunların % 36'ında *GSTP1* geninde metilasyon saptanırken, % 64'ünde metilasyon gözlenmemiştir.

* Prostat kanser tanısı almış 76 olgunun % 32,89'unun 65 yaş üzerinde olduğu ve bunların % 32'inde *CDH13* geninde metilasyon saptanırken, % 68'inde metilasyon gözlenmemiştir.

* Prostat kanser tanısı almış 76 olgunun % 32,89'unun 65 yaş üzerinde olduğu ve bunların % 28'inde *TP53* geninde metilasyon saptanırken, % 72'inde metilasyon gözlenmemiştir.

* Prostat kanser tanısı almış 76 olgunun % 32,89'unun 65 yaş üzerinde olduğu ve bunların % 25'inde *TP73* geninde metilasyon saptanırken, % 75'inde metilasyon gözlenmemiştir.

* Prostat kanser tanısı almış 76 olgunun % 32,89'unun 65 yaş üzerinde olduğu ve bunların % 20'inde *CD44* geninde metilasyon saptanırken, % 80'inde metilasyon gözlenmemiştir.

* Prostat kanser tanısı almış 80 olgunun % 32,89'unun 65 yaş üzerinde olduğu ve bunların % 16'ında *ESR1* geninde metilasyon saptanırken, % 84'ünde metilasyon gözlenmemiştir.

* Prostat kanser tanısı almış 76 olgunun % 32,89'unun 65 yaş üzerinde olduğu ve bunların % 12'inde *WT1* geninde metilasyon saptanırken, % 88'inde metilasyon gözlenmemiştir.

* Prostat kanser tanısı almış 76 olgunun % 32,89'unun 65 yaş üzerinde olduğu ve bunların % 20'inde *RBI* geninde metilasyon saptanırken, % 80'inde metilasyon gözlenmemiştir.

* Prostat kanserli 76 olguda gerçekleştirilen MS-MLPA analizinin ardından örneklerin metilasyon durumları ve klinikopatolojik parametreleri arasında istatistiksel bir yöntem olan Ki-kare testi gerçekleştirilmiş ve Ki-kare testi sonucunda 76 olgunun genel metilasyon durumu ve klinikopatolojik parametreleri (yaş, evre ve Gleason skoru) arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

* Çalışmamızda metilasyon yüzdesi en sık bulunan 9 gene Ki-kare testi uygulandığında; *RARβ* geni metilasyon durumu ile klinikopatolojik parametrelerden yaş ve evre arasında anlamlı bir ilişki saptanmış fakat bu genin metilasyon durumu ve Gleason Skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

* *ESR1* geni metilasyon durumu ile klinikopatolojik parametrelerden Gleason Skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuş fakat yaş ve evre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

* *RB1* geni metilasyonu durumu ile klinikopatolojik parametrelerden evre arasında anlamlı bir ilişki saptanmış fakat yaş ve Gleason Skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

* *MSH6*, *GSTP1*, *CDH13*, *TP73*, *CD44* ve *WT1* genlerinin metilasyon durumları ve klinikopatolojik parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

* Başarılı bir MS-MLPA analizinde en önemli kademelerin, parafine gömülü dokulardan yeterli ve kaliteli DNA izole etmek olduğu saptanmıştır. Yetersiz ve kirli DNA miktarı

elde edilen piklerin kalitesini azaltmakta ve pik analizinde sorunlara, yanlış-pozitif ya da yanlış-negatif gibi neticelere sebep olmaktadır.

* MS-MLPA analizi, birçok genin aynı anda metilasyon profilini inceleyebilen, etkin, ucuz, kolay ve hızlı bir yöntemdir. MS-MLPA yöntemi, metilasyon paternlerini belirleyen diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında iş, zaman ve maliyet bakımından çok daha ekonomik olduğu gözlenmiştir.

* Son yıllarda prostat kanser erken tanısı için, kandan DNA örneklerinden birçok tümör baskılayıcı genin metilasyon profilleri araştırılmıştır. Farklı metilasyon tarama yöntemleriyle karşılaştırıldığında, MS-MLPA analizi en iyi özgüllük ve duyarlılığa sahip yöntemdir. Prostat kanserinin erken tanısında rol oynayan markerlere özgü kit dizaynları yapılarak rutin kullanıma geçirilebilir.

*Sonuç olarak MS-MLPA yöntemi, prostat kanserinde bir reaksiyonda birçok tümör baskılayıcı genin metilasyon profillerini belirleyen, hızlı ve maliyeti düşük moleküler bir tekniktir.

7.KAYNAKLAR

- Agundez M., Grau L., Palou J., Algaba F., Villavicencio H., and Sanchez-Carbayo M. (2011) Evaluation of the methylation status of tumour suppressor genes for predicting bacillus Calmette-Guerin response in patients with T1G3 high-risk bladder tumours. *European Urology*, 60(1): 131-40.
- Ahn SK, Kim K, Choi İJ and Lee JM. (1991) Adenoid Cystic Carcinoma of the Prostate Gland. *Yon. Med. J.*,74-78.
- Bird A (2002), DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*, 16(1):6-21.
- Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ and Macleod D. (1985), A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell*, 40:91-9.
- Bogdanovic, O. and Veenstra, G. J. (2009) DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*, 118(5): 549–65.
- Bostwick D.G. (2003) Surgical pathology of the prostate, Modern Surgical Pathology, Chapter32, Ed: WidnerN., CoteR.J.,Suster S.,WeissL.M., *Elsevier Science*, Philadelphia, 1149-1196.
- Boyle P, Severi G, Giles GG (2003) The epidemiology of prostate cancer. *Urol. Clin. North. Am.*, 30: 209-217.
- Izzo A, Schneider R. (2011) Briefings in *Functional Genomics*, 9 (6):429-443.
- Cooper, G. M., and Hausman, R. E. (2006) Hücre: Moleküler Yaklaşım, Çev. Edi.: Sakızlı, M., Atabey, N., *İzmir Tıp Kitabevi*, İzmir, say. 631-5, 657-64.
- De MarzoA.M., Nelson W.G.,Isaacs W.B. and Epstein J.I. (2003) Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lanset*; 361: 955-964
- Eble JN, Sauter G, Epstein J, Sestern IA. (2004) Tumors of Prostate In : World Health Organisation of Tumors. Tumors of Urinary system and Male Genital Organs. *IARC*, 159-213.
- Eble j., Sauter G., Epstein Jive et. all. (2004). World health organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of urinary system and male genital organs. *LYON:IARCC Press*, 2004

- Enokida, H. and Nakagawa, M. (2008) Epigenetics in bladder cancer. *Int J Clin Oncol.*, 13: 298-307.
- Epstein JI, Partin AW, Sauvageot J, et al. (1996) Prediction of progression following radical prostatectomy. A multivariate analysis of 721 men with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol*, 20:286–92.
- Epstein J.I. (2004) The prostate and seminal vesicles, Sternberg's Diagnostic Pathology, 4th ed, Vol:III, **Lippincott Williams & Wilkins**, Philadelphia, Chapter 45, 2083-2132
- Erol D., Elyas Z., ve Ünal S. (2010) Psikiyatrik Hastalıkların Gelişiminde Epigenetik Mekanizmalar. *Klinik Psikiyatrik Hastalıkların Gelişiminde Epigenetik Mekanizmalar. Klinik Psikiyatrik Hastalıkların Gelişiminde Epigenetik Mekanizmalar*, 20: 109-14.
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M and Boyle P. (2006) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe . *Ann Oncol* , (2007), 18:581-92.
- Fidaner C, Eser SY and Parkin DM (2001) Incidence in Izmir in 1993-1994: first results from Izmir Cancer Registry. *Eur J Cancer*. 37(1):83-92.
- Franco EL and Harper DM (2005). Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control *Vaccine* 23: 2388-2394.
- Weaver RF, Hedrick PW (1997). *Genes and Cancer*. In eds. Genetics. 3rd ed. Wm. Dubuque C: Brown Publishers; 482-503.
- Gleason DF. (1966) Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*, 50: 125–28
- Gleason DF, Mellinger GT (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol.*, 11: 58–64.
- Hamilton, J. P. (2011) Epigenetics: Principles and Practice. *Digestive Diseases*, 29(2): 130-5.
- Harnden P, Shelley MD, Coles B, Staffurth J and Mason MD (2007). Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components. *Lancet Oncol.* 8(5):411-9.
- Hoffman, A. M., and Cairns, P. (2011) The Epigenetics of kidney cancer and bladder cancer. *Epigenomics*, 3(1): 19-34.
- Hsing AW, Tsao L and Devesa SS (2000) International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer*. Jan 1;85(1):60-67
- IARC (2004). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Tobacco smoke and involuntary smoking Lyon, Fransa: International Agency for Research on Cancer volume 83.

- Jemal A, Bray F, Center MM, et al. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 69-90
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C and Thun MJ (2006) Cancer statistics, . *CA Cancer J Clin.* 56(2):106-30.
- Jeronimo C, Varzim G, Henrique R, et al. (2002) I105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11:445-50.
- Jeronimo, C., and Henrique R. (2011) Epigenetic biomarkers in urological tumors: A systematic review. *Cancer Letters.*
- Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, et al.(2001) Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organconfined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 93:1747-52
- Mclaughin J.R., Dryer D. (2000) Canadian Cancer Statistics, National Cancer Institute of Canada: ISSN 0835-2976. Toronto,Canada.
- Epstein J.I. and Yang J.X. (2002) Prostate biopsy interpretation. Third Edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins; 64-77.
- Jones PA, Baylin SB. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3:415
- Jones PA, Takai D.(2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 293:1068-7
- Kosova B., Özel, R., ve Aktan, Ç. (2011) Prostat kanseri tanısında DNA metilasyonunun yeri var mı?. *Üroonkoji Bülteni*, 2: 33-40.
- McKenney JK, Amin MB, Srigley JR, vd (2004) Basal cell proliferations of the prostate other than usual basal cell hyperplasi: a clinicopathologic study of 23 cases, including four carcinomas, with a proposed classification. *Am J Surg Pathol*, 28: 1289-1298.
- MacLean CH, Newberry SJ, Mojica WA et. at all. (2006). Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review *JAMA.* 295:403-415.
- Majumdar, S., Buckles, E., Estrada, J. and Koochekpour S. (2011) Aberrant DNA Methylation and Prostate Cancer. *Current Genomics*, 12(7): 486–505.
- Mellinger GT, Gleason D, Bailar J 3rd (1967). The histology and prognosis of prostatic cancer. *J Urol*, 97: 331–37
- Minei S, Hachiya T, Ishida H and Okada K. (2001). Adenoid cystic carcinoma of the prostate: A case report with immunohistochemical and in situ hybridization staining for prostate-specific antigen. *Int J Urol*, 8: 41-44.

- Mostofi FK, Sesterhenn IA and Davis CJ JR (1993) A pathologist's view of prostatic carcinoma. *Cancer*, Feb 1;71(3 Suppl):906-932. Review
- Park SY, Murphy SP, Wilkens LR, et. all. (2007). Fat and meat intake and prostate cancer risk: the multiethnic cohort study. *Int J Cancer*, 121:1339-1345.
- Parkin DM, Bray FI, Devesa SS (2001). Cancer Burden in the year 2000. The global Picture, *Eur J Cancer*, 37: S4-S66.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J (1997) Editors Cancer incidence in five continents. Vol 7 Lyon France; International Agency for research.
- Partin AW, Kattan MW, Subong EN, et at all (1997). Combination of prostatespecific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update. *JAMA*, 277:1445-51.
- Pedro Silva IE, Osorio Acosta V and Farfan Chavez FA.(2006). Cystic adenoid carcinoma of the prostate . Report of two cases, *Arch Esp Uro.*, ; 59: 823-825.
- Potosky AL, Kessler L, Gridley G, Brown CC and Horm JW (1990) Rise in prostatic cancer incidence associated with increased use of transurethral resection. *J Natl Cancer Inst.* Oct 17;82(20):1624-1628.
- Potolsky AL, Miller BA, Albertsen PC and Kramer BS (1995) The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer. *JAMA*, 15:273(7):548-55
- Rosai J (2004), Male Reproductive System (Chapter 18), Rosai ve Ackerman's Surgical Pathology, Elsevier Inc. 1361-1411
- Sanchez-Carbayo M. (2012) Hypermethylation in bladder cancer: biological pathways and translational applications. *Tumor Biol.*, 33(2): 347-61.
- Seies.Holund B. 1980 Latent prostatic cancer in a consecutive autopsy series. *Scand J Urol. Nephrol*, 14:29
- Sharma, S., Kelly, T. K., and Jones, P. A. (2010) Epigenetics in cancer. *Carsinogenesis*, 31(1): 27-36.
- Cedric R. Clapier and Bradley R. Cairns (2009) The Biology of Chromatin Remodeling Complexes *Annu. Rev. Biochem.* 78:273-304.
- United Nations Department of Economic and Social Affairs (2007). World population prospects: the 2006 revision. (Dünya nüfus öngörülere: 2006 revizyonu) New York: United Nations
- WHO Sekreteryası (2005). Cancer Prevention and Control Report by the Secretariat to the 58th World Health Assembly.
- Wingo PA, Tong T and Bolden S (1995) Cancer statistics, *CA Cancer J Clin.* Jan-Feb;45(1):8-30. Erratum in: *CA Cancer J Clin* 1995 Mar-Apr;45(2):127-8.

Web_1(2012). Medscape Multispecialty. [www. medscape.com](http://www.medscape.com) The Role of Cancer Research in Noncommunicable Disease Control

Web_2(2005).SanofiTürkiye.<http://www.sanofi.com.tr>

Web_3(2006). 2004 yılı Türkiye kanser istatistikleri
<http://www.sydh.gov.tr/site/ketem/ketemist.asp>

Web_4(2010).http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f6/Cancer_progression_from_NIH.png

Web_5(2011).Medikal blog <http://www.medikalblog.net/wp-content/uploads/2011/08/kanser-istatistikleri1.jpg>

Web_6(2009). <http://communities.zeelandnet.nl/borstkanker/pagina/22696>

Web 7(2010).vekansergitti.blogspot.com/2010/06/kanserin-gelisim-sureci.html

Web8(2007).<http://www.kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-kayitciligi/108-t%C3%BCrkiyede-kanser-kayitcigi.html>

Web 9(2009). <http://www.beginbeforebirth.org/the-science/epigenetics>

Web10(2011).Profesör Le Dinh Luong. Basic principles of genetics.
<http://cnx.org/content/m26565/latest/>

Web 11(2010). http://genetikveepigenetik.blogspot.com/2013_01_01_archive.html

Web 12(2009).<http://cerch.org/research-programs/chamacos/chamacos-epigenetics/>

WEB_13(2010).MRC-Holland. www.mlpa.com

8.ÖZGEÇMİŞ

Esin ÖZCAN 1987 yılında Denizli’de doğdu. İlkokulu, ortaokulu ve liseyi Denizli’de okuduktan sonra, üniversiteyi de 2005-2010 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde, okudu. 2011 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.