

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

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER
KANSERLERİNDE EGFR MUTASYONLARININ
TARANMASI ve BU MUTASYONLARIN PTEN ve
Mcl-1 PROTEİN EKSPRESYON SEVİYELERİ İLE
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Zafer ÇETİN

Doktora Tezi

Antalya,2008

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

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER
KANSERLERİNDE EGFR MUTASYONLARININ
TARANMASI ve BU MUTASYONLARIN PTEN ve
Mcl-1 PROTEİN EKSPRESYON SEVİYELERİ İLE
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Zafer ÇETİN

Doktora Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafında desteklenmiştir.

(Proje No: 2005.03.0122.002)

‘Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir’

Antalya,2008

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (Orijinalleri ekte sunulmuştur).

1. Alper OM, Erengin H, E. Manguoğlu A, Bilgen T, **Cetin Z**, Dedeoğlu N, Luleci G. Consanguineous marriages in the province of Antalya, Turkey. *Ann. Genet.* 2004, Apr-Jun; 47(2):129-138.
2. **Çetin Z**, Karaüzüm SB, Yakut S, Mıhçı E, Baumer A, Wey E, Taçoy Ş, Bağcı G, Lüleci G. M-FISH Applications in Clinical Genetics. *Genet Couns*, 2005. (16)3 : p. 257-68.
3. SB. Karaüzüm, T Bilgen, I Karadogan, S Yakut, **Z Cetin**, A Uğur, G Lüleci. Novel Cytogenetic Findings revealed by Conventional Cytogenetic and FISH Analyses in Leukemia Patients. *Exp Oncol.* 2005;27:229-232.
4. **Cetin Z**, Tezcan G, Berker-Karauzum S, Kupesiz A, Esra-Manguoglu A, Yesilipek A, Luleci G, Hazar V. Donor cell-derived acute myeloblastic leukemia after allogeneic peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation for juvenile myelomonocytic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2006;28(11):763-7.
5. D.A. Senses, F. Sılan, H. Uzun, D. Alagoz, C. Zafer, K. Kocabay, S.B. Karauzum, **Z. Cetin**. Partial Trisomy 4(q31qter) Due to Maternal 4;5 Balanced Translocation in a Neonate. *Genetic Counseling* 2007;18(2):193-170.
6. Güzeloglu-Kayışlı O, **Cetin Z**, Keser I, Ozturk Z, Tuncer T, Canatan D, Luleci G. Relationship between the SP1 polymorphism and osteoporosis in beta Thalassemia major patients. *Pediatrics International.* 2008;50(6):1-3.
7. Simsek M, **Cetin Z**, Bilgen T, Keser I, Luleci G. Effects of hormone replacements therapy on bone mineral density in Turkish patients with or without COL1A1 Sp1 binding site polymorphism. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research.* 2008;34(1):73-7.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında doktora (PhD) tezi olarak kabul edilmiştir. / / 2007

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Güven LÜLECI

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. İbrahim KESER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Yrd. Doç. Dr. Abdullah ERDOĞAN

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi

Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / 2007 tarih ve / sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Nurettin OĞUZ

Enstitüsü Müdürü

ÖZET

EGFR proteini epitelyal hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen bir protein olup pek çok solid tümörde aşırı ekspresyonu gözlenmektedir. EGFR sinyal iletim yolağı, akciğer kanserlerinin gelişiminde işe karışan hücresel yolakların en önemlilerinden biridir. EGFR'ın aktive olması sonucunda hücre proliferasyonu, tümör invazyonu, metastaz, antiapoptotik sinyal iletimi, kemoterapiye direnç, ve tümör damarlanması ile ilişkili sinyal yolakları aktive olmaktadır. Yapılan çalışmalar normal mukozadan epitelyal hiperplazi ve kansere geçişde EGFR ekspresyonunun kademeli olarak arttığını göstermiştir. NSCLC tedavisinde en yaygın olarak incelenmiş olan hedeflenmiş terapiler EGFR proteininin ekstraselüler bölgesine bağlanan antikorlar ve tirozin kinaz fonksiyonunu baskılayan küçük moleküllerdir. Yapılan çalışmalar, EGFR geni mutasyonlarının ve EGFR proteini ekspresyon artışının EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine cevaplılığı öngören markırlar olabileceğini göstermiştir. Hücre hatları ile yapılan çalışmalar PTEN'in yer aldığı PI3K yolağının inhibisyonunun ve Mcl-1 ekspresyonunun baskılanmasının EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinin etkinliğini arttırdığını göstermektedir. Ancak bu proteinlerin NSCLC'li olguların tümör dokularındaki ekspresyonları arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Bu çalışmada, NSCLC tanılı 50 olgunun tümör dokularında dizi analizi yöntemiyle EGFR geninde mutasyon taraması yapılmıştır. Ayrıca Western-blot yöntemi ile EGFR, PTEN ve Mcl-1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Olguların tümör dokularının patolojik olarak değerlendirilmesi sonucunda, 9 tanesi adenokarsinom, 30 tanesi yassı epitel hücreli karsinom, 9 tanesi adenosquamöz karsinom, 2 tanesi ise büyük hücreli karsinom olarak belirlenmiştir. Değerlendirilen 50 olgunun ikisinde EGFR geninin 19. ekzonunda heterozigot durumda, c.2235_2249 (p.Glu746_Ala750del) mutasyonu belirlenmiştir. Ayrıca, 5 olguda (% 10) heterozigot durumda 18. intronda daha önce literatürde bildirilmiş olan 2184+19 G/A polimorfizmi, 8 olguda (% 16) heterozigot durumda 18. intronda daha önce tanımlanmamış olan 2184+100 C/T polimorfizmi belirlenmiştir. 6 olguda (%12) yine heterozigot durumda 19. intronda daha önce tanımlanmış olan 2283+69 G/A polimorfizmi belirlenirken, 19. intronda daha önceden tanımlanmış 2283+96 A/G polimorfizmi de saptanmıştır. Bu polimorfizme ait allellerin dağılımı ise şu şekildedir; AA; 22/50 (% 44), AG; 17/50 (% 34), GG; 11/50 (% 22). İncelenmiş olan olgunun 23'ünde (% 46) EGFR proteini ekspresyonunda artış, 17'sinde (% 34) PTEN protein ekspresyonunda azalma, 15'inde (% 30) Mcl-1 ekspresyonunda artış belirlenmiştir. Ayrıca, EGFR proteini ekspresyonu artışı ya da EGFR geni mutasyonuna sahip dokular aynı zamanda PTEN ekspresyonu kaybı ya da Mcl-1 proteini ekspresyonu artışına da sahip olabildiği gösterilmiştir. Bu nedenle EGFR proteinini hedefleyen ilaçlarla birlikte, PI3K/Akt yolağı inhibisyonunu ve ya Mcl-1 ekspresyonunun baskılanmasını sağlayacak yeni biyolojik ajanların kullanılmasının EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinin etkinliğini arttırabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, EGFR, Mcl-1, PTEN.

ABSTRACT

EGFR, expressed on epithelial cell surfaces, is frequently overexpressed in most of solid tumours. EGFR signaling pathway is one of the important pathways playing a role in development of lung cancer. Activation of the EGFR leads to activation of cellular pathways associated with cell proliferation, invasion, metastasis, antiapoptotic signal transduction, drug resistance and angiogenesis. Recently, it has been demonstrated that, EGFR expression levels are elevated through lung carcinogenesis. Most important targeted therapies evaluated in NSCLC include EGFR monoclonal antibodies and EGFR tyrosine kinase inhibitors. Recent studies showed that EGFR gene mutations and EGFR overexpression may be useful predictive markers for response to EGFR targeting drugs. Studies in lung cancer cell lines, indicated that inhibition of PI3K signaling and Mcl-1 downregulation may elevate the effectiveness of the EGFR TKI's in tumour cells. PTEN and Mcl-1 protein expression levels in EGFR overexpressed or mutated NSCLC tumour tissue samples are not well studied. In this study, we evaluated, EGFR gene mutations by direct sequencing in NSCLC tumour tissues. In addition, EGFR, PTEN and Mcl-1 protein expression levels evaluated by Western-blotting. Histopathological evaluations revealed that, 30 were adenocarcinoma, 30 were squamous cell carcinoma, 9 were adenosquamous carcinoma, and 2 were large cell carcinoma. We detected c.2235_2249 (p. Glu746_Ala750del) mutation in exon 19 in two cases. In addition, we detected, 2184+19 G/A polymorphism in intron 18 in 5 cases (10%), 2184+100 C/T polymorphism in intron 18 in 8 cases (16%), 2283+69 G/A polymorphism in intron 19 in 6 cases (12%). Distribution of the alleles of 2283+96 A/G polymorphism in intron 19 was as follows: AA,21/50 (42%), AG;16/50 (32%), GG;11/50 (22%). According to Western-blotting we detected EGFR overexpression in 23 cases (46%), reduction of PTEN expression in 17 cases (34%), and Mcl-1 overexpression in 15 cases (30%). Also we showed that EGFR mutated or overexpressed tumour tissues also have reduction in PTEN expression or Mcl-1 overexpression. Therefore, approaches targeting these two proteins in addition to EGFR tyrosine kinase inhibitors may accelerate the effectiveness of EGFR tyrosine kinase inhibitors.

Key Words: Nonsmall Cell Lung Cancer, EGFR, Mcl-1, PTEN.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca yol göstericiliği ve desteği için sayın danışman hocam Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM'e,

Tez çalışmama önerileri ile katkıda bulunan, destek ve ilgisini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Güven LÜLECİ'ye

Tez savunma sınavımda jüri üyeliği yapan sayın hocalarıma,

Doktora tez çalışmam ile ilgili resmi işlemleri yürüten Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Çalışmam süresince destekleri ve yardımları için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ekibine,

Çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Abdullah ERDOĞAN'a ve Patoloji Anabilim dalı öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülay ÖZBİLİM'e,

Tüm Eğitim yaşantım boyunca göstermiş oldukları sabır ve destekleri için tüm aileme içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	
2.1 Normal Akciğer Dokusunun Yapısı	2
2.2 Akciğer Kanserlerinin Tanısı ve Evrelendirilmesi	2
2.3 Akciğer Kanserlerinin Histolojik Alt Tipleri	4
2.4. Akciğer Kanseri Gelişiminde Etkili Faktörler	5
2.4.1 Akciğer Kanseri ve Çevresel Ajanlar	5
2.4.2 Akciğer Kanseri Gelişiminde Etkili Endojen Faktörler	6
2.5 Akciğer Kanserlerinde Çok Basamaklı Karsinogenez	7
2.6 Küçük Hücreli Akciğer Kanserlerinde Gözlenen Genetik Değişimler	8
2.7 Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserlerinde Gözlenen Genetik Değişimler	8
2.7.1 Kopya Sayısı Değişimleri ve Heterozigosite Kayıpları	8
2.7.2 Tümör Süpresör Gen Değişimleri	9
2.7.2.1 P53 gen değişimleri	9
2.7.2.2 Rb geni değişimleri	9
2.7.2.3 P16 Gen değişimleri	9
2.7.2.4 PTEN Geni Değişimleri	10
2.7.3 Onkogenlerde Meydana Gelen Değişimler	10
2.7.3.1 K-ras Geni Mutasyonları	10
2.7.3.2 Myc gen değişimleri	10
2.8 EGFR Sinyal İletim Yolağı	11
2.8.1. Ras/RAF/MAPK Yolağı	12
2.8.2. Signal Transduction and Activator of Transcription (STAT)Yolağı	12
2.8.3. Fosfotidil Inozitol 3- Kinaz (PI3-K)/Akt Yolağı	13
2.9. Apoptoz Sinyalleri	14
2.9.1. Ölüm Reseptörleri ile Oluşturulan Apoptoz	14
2.9.2. Mitokondri Bağımlı Apoptoz	15
2.9.2.1. Bcl-2 ailesi Üyeleri ve Apoptoz	15
2.10 NSCLC'DE Konvensiyonel Tedavi	17
2.11 EGFR Tirozin Kinaz İnhibitörü (TKI) Temelli Hedeflenmiş Terapiler	18
MATERYAL ve METODLAR	
3.1 Periferel Kandan DNA İzolasyonu	22
3.1.1 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	22
3.1.2 Uygulanan İşlemler	23
3.2 Tümör Dokularından DNA İzolasyonu	23
3.2.1 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	24

3.2.2 DNA İzolasyonu Sırasında Uygulanan İşlemler	24
3.3 DNA Miktarının Ölçülmesi	24
3.4 PCR için kullanılan primer dizileri	25
3.5 PCR Karışımının Hazırlanması	25
3.6 EGFR Geni Ekzon 18, 19 ve 21'in PCR İşlemi ile Amplifikasyonu	25
3.7 PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu	25
3.7.1 PCR Pürifikasyon İşlemleri	26
3.8 Dizi Analizi PCR Reaksiyonunun Kurulması	26
3.9 Sodyum Asetat ile Dizileme Sonrası Pürifikasyon	26
3.10 Tümör ve Kontrol Dokulardan Protein Lizatlarının Elde Edilmesi	29
3.10.1 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	29
3.10.2 Protein Lizatlarının Elde Edilmesi Sırasında Uygulanan İşlemler	30
3.11 Standart Protein Grafiğinin Hazırlanması	30
3.11.1 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	30
3.11.2 Protein Dilüsyon Serisinin Absorbanslarının Ölçülmesi	30
3.12 Dokulardan Elde Edilen Proteinlerin Miktar Tayini	30
3.13 Western- blot	30
3.13.1 Western-blot'da Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	30
3.13.2 Örneklerin Yükleme İçin Hazırlanışı	32
3.13.3 Örneklerin Yüklenmesi ve Elektroforez	32
3.13.4 Proteinlerin Jelden Membrana Transferi (Islak Transfer)	32
3.13.4.1 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	32
3.13.4.2 Proteinlerin Transferi Sırasında Uygulanan İşlemler	33
3.13.5 Membranların Blotlanması (Antikor ile İşaretlenmesi)	33
3.13.5.1 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	33
3.13.5.2 Membranların Antikor ile İşaretlenmesi Sırasında Uygulanan İşlemler	33
3.13.6 Tümör ve Kontrol Örneklerinde Protein Ekspresyon Miktarlarının Belirlenmesi	34
BULGULAR	
4.1 Tümör Materyalinin Patolojik ve Histolojik Olarak İncelenmesi	35
4.2 EGFR Geni Tirozin Kinaz Domain Mutasyon ve Polimorfizmleri	37
4.3 Western-blot Sonuçları	29
4.3.1 Normal Akciğer Dokusu ve Tümör Dokularında EGFR Protein Miktarları	29
4.3.2 Normal Akciğer Dokusu ve Tümör Dokularında PTEN Protein Miktarları	39
4.3.3 Normal Akciğer Dokusu ve Tümör Dokularında Mcl-1 Protein Miktarları	40
4.4 Klinik Takip	40
TARTIŞMA ve SONUÇLAR	43
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	57
EKLER	
Ek-1. Alper OM, Erengin H, E. Manguoğlu A, Bilgen T, Cetin Z , Dedeoğlu N, Luleci G. Consanguineous marriages in the province of Antalya, Turkey. Ann. Genet. 2004, Apr-Jun; 47(2):129-138.	

Ek-2. Çetin Z, Karaüzüm SB, Yakut S, Mihçı E, Baumer A, Wey E, Taçoy Ş, Bağcı G, Lüleci G. M-FISH Applications in Clinical Genetics. *Genet Couns*, 2005. (16)3 : p. 257-68.

Ek-3. SB. Karaüzüm, T Bilgen, I Karadogan, S Yakut, **Z Cetin**, A Uğur, G Lüleci. Novel Cytogenetic Findings revealed by Conventional Cytogenetic and FISH Analyses in Leukemia Patients. *Exp Oncol*. 2005;27:229-232.

Ek-4. Cetin Z, Tezcan G, Berker-Karauzum S, Kupesiz A, Esra-Manguoglu A, Yesilipek A, Luleci G, Hazar V. Donor cell-derived acute myeloblastic leukemia after allogeneic peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation for juvenile myelomonocytic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006;28(11):763-7.

Ek-5. D.A. Senses, F. Silan, H. Uzun, D. Alagoz, C. Zafer, K. Kocabay, S.B. Karauzum, **Z. Cetin**. Partial Trisomy 4(q31qter) Due to Maternal 4;5 Balanced Translocation in a Neonate. *Genetic Counseling* 2007;18(2):193-170.

Ek-6. Güzeloglu-Kayışlı O, **Cetin Z**, Keser I, Ozturk Z, Tuncer T, Canatan D, Luleci G. Relationship between the SP1 polymorphism and osteoporosis in beta Thalassemia major patients. *Pediatrics International*. 2008;50(6):1-3.

Ek-7. Simsek M, **Cetin Z**, Bilgen T, Keser I, Luleci G. Effects of hormone replacements therapy on bone mineral density in Turkish patients with or without COL1A1 Sp1 binding site polymorphism. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2008;34(1):73-7.

SİMGELER ve KISALTMALAR

TNM	: Tümör-Nod.Metastaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
LOH	: Heterozigosite kaybı
Rb	: Retinoblastoma
CYP2D6	: Cytochrome P450, Subfamily IID, Polipeptid 6
CYP1A1	: Cytochrome P450, Subfamily I, Polipeptid 1
GST	: Glutasyon S-Transferaz
XRCC1	: Ray Repair, Complementing Defective, in Chinese Hamster, 1
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
AAH	: Atipik Adenomatöz Hiperplazi
BCCD	: Bronşial Kolumnar Hücre Displizisi
BAC	: Bronkoalveolar karsinom
SCLC	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homolog
NSCLC	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
FHIT	: Frajil Histidin Triad
RASSF1A	: Ras Association Domain Family Protein 1
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
PI3K	: Fosfotidil Inozitol 3 Kinaz
PIP3	: Fosfotidil Inozitol 3,4,5 Trifosfat
Akt	: V-Akt Mürin Timoma Viral onkogen Homolog 1
JAK2	: Janus Kinaz 2
Src2	: V-Src avian sarkoma viral onkogen
STAT3	: Signal Transducer and Activator of Transcription 3
Grb2	: Büyüme Faktörü Reseptörü- bağlı protein 2
SOS	: Son of sevenles
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
bFGF	: basic Fibroblast Büyüme Faktörü
MMP-9	: Matriks metalloproteinaz 9
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinaz Kinaz 4
ESCRT	: Endosomal sorting complex Required for Transport
ERCC1	: Excision-Repair, complementing Defective, in Chinese Hamster, 1
TKI	: Tirozin Kinaz İnhibitörü
Mcl-1	: Myeloid cell leukemia 1
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
FADD	: Fas Associated Death Domain
TRADD	: TNFR associated death domain
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Akciğer kanseri histolojik alt tiplerinin Hematoksilen-Eozin ile boyama görünümleri.	5
2.2. EGFR ekzonları ve kodladığı protein bölgeleri.	11
2.3. EGFR sinyal iletim yolağı.	14
2.4. Hücrel apoptoz yolakları.	15
2.5. Mcl-1 geni, mRNA'sı ve proteininin yapısı	17
3.1. EGFR geninin cDNA nükleotid dizilimi ve amino asit kodları.	29
4.1. a-b) c.2235_2249del mutasyonunun forward ve reverse primerler ile elde edilen dizi analizi görüntüsü. c) 2184+19 G/A polimorfizmi d) 2184+100 C/T polimorfizmi e) 2283+69 G/A polimorfizmi. f) 2283+96 A/G polimorfizmi	38
4.2. 27,28, 30 ve 31 numaralı olguların western-blot ile elde edilmiş EGFR ve GAPDH protein band paternleri. N; Normal doku, T;Tümör dokusu; * EGFR proteininde ekspresyon artışı gözlenen örnek.	39
4.3. 15,16,18, ve 19 numaralı olguların western-blot ile elde edilmiş PTEN ve GAPDH protein band paternleri. N; Normal doku, T;Tümör dokusu; * PTEN proteininde ekspresyon azalışı gözlenen örnek.	39
4.4. 15,16,18 ve 19 numaralı olguların western-blot ile elde edilmiş Mcl-1 ve GAPDH protein band paternleri. N; Normal doku, T;Tümör dokusu; * Mcl-1 proteininde ekspresyon artışı gözlenen örnek.	40

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Akciğer kanserlerinin TNM sınıflama sistemi.	3
2.2. Akciğer kanserlerinin TNM sınıflama sistemine göre evrelendirilmesi.	3
4.1. Çalışma kapsamında değerlendirilen olguların klinikopatolojik verileri.	36
4.2. Çalışma kapsamında değerlendirilen olgulara ait EGFR mutasyon ve polimorfizm dağılımları ve EGFR, PTEN ve Mcl-1 protein ekspresyon seviyeleri.	41
5.1. NSCLC'li olgularda EGFR mutasyonlarının sıklığını bildiren yayınlar ve EGFR geni TK domain mutasyonlarının toplumlara göre dağılımı.	49

GİRİŞ ve AMAÇ

Akciğer kanseri tüm dünyada erkeklerde ve kadınlarda ölüme sonuçlanan en önemli kanser türlerinden biridir. Tedavi alanındaki tüm gelişmelere rağmen akciğer kanserli hastaların 5 yıllık sağkalım oranları %15 civarındadır. Akciğer kanserleri, küçük hücreli (SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri (NSCLC) olarak iki ana grup altında değerlendirilmektedir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri yassı epitel hücreli karsinom, adenokarsinom, büyük hücreli karsinom ve miks tipler gibi farklı histopatolojik alt gruplara ayrılmaktadır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde hücre döngüsünün kontrolünde, hücre büyüme ve çoğalmasında, DNA tamirinde ve apoptozda rol oynayan pek çok gende ve bu genlerin ürünlerinde değişimler saptanmıştır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde en önemli sinyal yolağı epidermal growth faktör reseptör sinyal yolağıdır. Bu yolak, epidermal growth faktörün hücre yüzeyinde bulunan reseptörüne bağlanması sonucunda aktive olmakta ve hücre içerisinde farklı sinyal iletim yollarının aktive olmasına neden olmaktadır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde epidermal growth faktör reseptörü (EGFR) proteininin aşırı ekspresyonu yaygın olarak gözlenen bir genetik değişimdir. Bu nedenle son yıllarda küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere epidermal growth faktör reseptörü sinyal yolağını baskılamaya yönelik moleküler ajanların geliştirilmesine yönelinmiştir. Bu moleküler ajanların en önemli grubu EGFR tirozin kinaz domaini inhibitörleridir. Yapılan çalışmalar epidermal growth faktör reseptör proteini aşırı ekspresyonunun ve EGFR geni tirozin kinaz domaininde meydana gelen mutasyonların EGFR TKI'lere duyarlılığı iaret eden bir markır olabileceğini göstermiştir. Ancak EGFR TKI tedavisinde yaşanan en önemli sorun ilaca karşı gösterilen primer ya da sekonder dirençdir. Hücre hatları ile yapılan çalışmalar PTEN ve Mcl-1 proteinlerinin bu direncin kaynağı olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada NSCLC tanılı hastaların tümör dokularında EGFR geni tirozin kinaz domaini mutasyonları ve EGFR protein ekspresyonu ile PTEN ve Mcl-1 proteinleri ile ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

2.1 Normal Akciğer Dokusunun Yapısı

Akciğerler göğüs kafesi içinde bulunan ve loblardan oluşmuş bir çift solunum organıdır. Sağ akciğer üç, sol akciğer ise 2 lobdan oluşmaktadır. Üst solunum yolları, havanın ısıtılarak ve nemlendirilerek gaz alışverişinin yapıldığı bölgeler olan alveollere taşınmasını sağlayan yapılardır. Tübüler şekle sahip olan bu yapıların bu iç kısımları epitel hücreleri ile kaplıdır. Bronşlar 1 mm'den daha geniş çaplı olup kıkırdak dokuya sahipken, bronşiyoller 1 mm'den daha küçük çapa sahip olup kıkırdak içermezler. Bronş ve bronşiyoller silli hücreler, goblet hücreleri, bazal hücreler, nöroendokrin hücreler, yassı epitel hücreleri, clara hücreleri gibi farklı özelliklere sahip hücre tipleri içermektedirler. Terminal bronşiyoller duvarlarında alveol yapıları bulunan solunum bronşiyolleri ile sonlanırlar. Alveoller arasında bulunan alveoller arası duvarlar kılcal kan damarları, elastik lifler ve doku makrofajlarını içerir. Alveollerin iç kısmının % 97'si tip I pnömositler adı verilen epitelyal hücrelerle, geri kalan % 3'lük kısım ise tip II pnömositler ile döşelidir. Tip I pnömositler büyük yassı ve bölünme yeteneği olmayan hücrelerdir. Akciğerlerdeki gaz değişimi bu hücrelerin sitoplazmaları aracılığı ile gerçekleşmektedir. Küboidal yapıya sahip olan tip II pnömositler ise bölünebilen ve tip I pnömositlerin öncülleri olan hücrelerdir (1).

Akciğer dokusunda bulunan hücrelerde, hücre bölünmesi, hücre farklılaşması ve hücre ölümünü kontrol eden sinyal yollarının bozulması durumunda bu hücreler kontrolsüz olarak bölünüp çoğalma özelliği kazanabilmekte ve farklı histolojik özelliklere sahip kanser hücreleri oluşabilmektedir.

2.2 Akciğer Kanserlerinin Tanısı ve Evrelendirilmesi

Akciğer kanseri hem erkeklerde hem de kadınlarda ölüme sebebiyet veren en önemli kanserlerden biridir. Tanı anında hastaların % 90'ı hastalığı işaret eden semptomlara sahiptir. Ancak olguların % 30'u primer tümör ile ilişkili semptomlara sahipken, % 60'ı metastatik hastalık ile ilişkili sistemik semptomlara sahiptir. Sistemik semptomlar tümör dokusundan salınmakta olan peptidlerden veya tümör ilişkili antijenlere gösterilen immünolojik reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Akciğer kanseri semptomları a) lokal semptomlar, b) intratorasik yayılım ilişkili semptomlar, c) göğüs kafesi dışına yayılım ve metastaz ilişkili semptomlar ve d) paraneoplastik sendromlar olarak ayrılmaktadır. Akciğer kanserli olgularda tümör ile ilişkili olarak öksürük, nefes alıp vermede güçlük, kanlı balgam, göğüs ağrısı,

halsizlik, kilo kaybı, kemik ağrıları, hırıltılı nefes alma, yutma güçlüğü gibi semptomlar gözlenebilmektedir. Akciğer kanserinin tanısında göğüs radyografisi, bilgisayarlı tomografi, bronkoskopi, balgamın sitolojik incelenmesi, ince iğne biyopsisi, plevral aspirasyon ve biyopsisi gibi yöntemler kullanılmaktadır (2). Akciğer kanserlerinin sınıflandırılmasında (Tablo 2.1) ve evrelendirilmesinde (Tablo 2.2) Tümör Nodül Metastaz (TNM) sistemi kullanılmaktadır (3).

Tablo 2.1. Akciğer kanserlerinin TNM sınıflama sistemi.

PRİMER TÜMÖR (T)

T0: Primer tm belirtisi yok

Tis: Karsinoma in situ

T1: Geniş çapı ≤ 3 cm, akciğer ve visseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimale uzanmayan

T2: Geniş çapı > 3 cm, ana bronşlarda yerleşen ancak ana karınaya uzaklığı > 2 cm olan, visseral plevraya kadar uzanan, atelektazi veya pnömoniye neden olan

T3: Herhangi büyüklükte olan tümörün göğüs duvarı, diafragma, mediastinal plevra, perikard gibi yapılara invaze olması, ana bronş içinde karınaya 2 cm dan yakın yerleşmesi, tüm akciğeri kaplayan atelektazi veya pnömoniye neden olması

T4: Herhangi büyüklükte olan tümörün mediasten yağ dokusu, kalp, büyük damarlar, trakea özofagus, vertebral kolon, karina gibi yapıları tutması, malign plevral veya perikardial sıvı bulunması, tümör ile aynı lob içinde satelit nodül bulunması

BÖLGESEL LENF BEZİ (N)

N0: Bölgesel lenf bezi yok

N1: İpsilateral peribronşial ve/veya hilar lenf bezi metastazı (akciğer içi lenf bezi)

N2: İpsilateral mediastinal lenf bezi metastazı (Subkarinal dahil)

N3: Kontralateral mediastinal veya supraklaviküler lenf bezi metastazı

UZAK METASTAZ (M)

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

Tablo 2.2. Akciğer kanserlerinin TNM sınıflama sistemine göre evrelendirilmesi.

EVRE	0:	Karsinoma in situ (Tis N0 M0)		
EVRE IA:	T1	N0	M0	
EVRE IB :	T2	N0	M0	
EVRE IIA:	T1	N1	M0	
EVRE IIB:	T2	N1	M0	
	T3	N0	M0	
EVRE IIIA:	T3	N1	M0	
	T1-2-3	N2	M0	
EVRE IIIB:	T4	N	M0	
	T	N3	M0	
EVRE IV:	T	N	M1	

2.3 Akciğer Kanserlerinin Histolojik Alt Tipleri

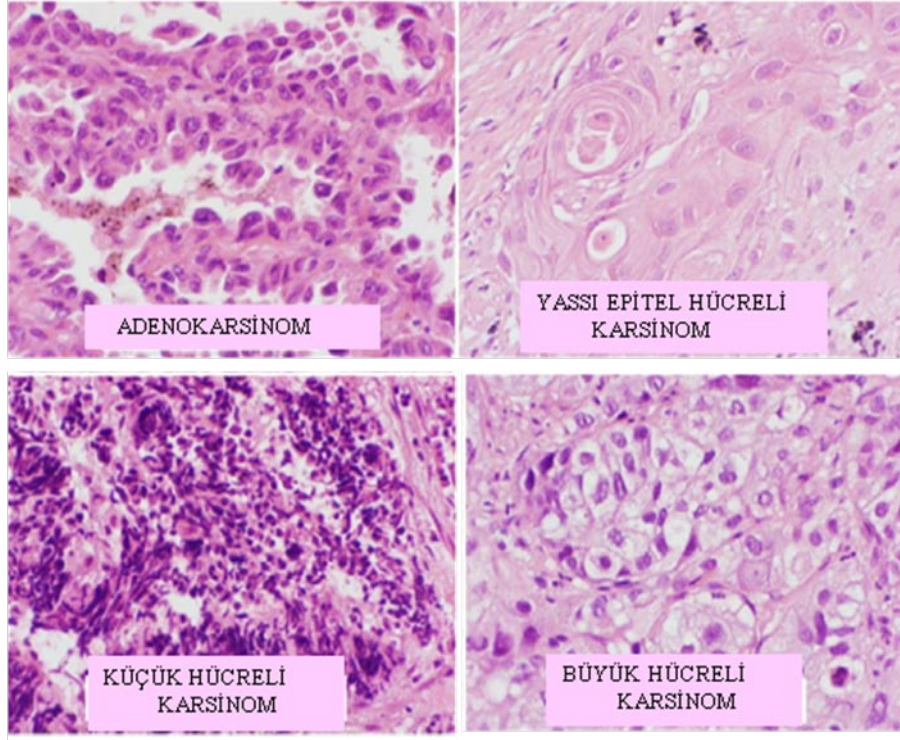
Akciğer kanserinin birbirinden farklı histolojik alt tipleri bulunmaktadır. Akciğer kanserlerinin % 20-25'i küçük hücreli (SCLC) histolojik alt tipine ait olup, % 70-75'i ise küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri grubu (NSCLC) altında değerlendirilmektedir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin % 25-30'unu yassı hücreli karsinom, % 30-35'ini adenokarsinom, % 10-15'ini ise büyük hücreli karsinom oluşturmaktadır. Bu yaygın olarak görülen ana histopatolojik alt tiplere ilaveten bu gruplara ait özellikleri kombine olarak taşıyan tümörler ve diğer nadir akciğer kanseri histolojik alt tipleri de bulunmaktadır (4). NSCLC histolojik alt tiplerinin mikroskopik görünümü Şekil 2.1'de verilmiştir.

Küçük hücreli akciğer karsinomları: Erkeklerde kadınlardan daha sık olarak gözlenen bir akciğer kanseri tipidir. Sigara tüketimi bu kanserlerin ortaya çıkmasında çok önemli rol oynamaktadır. Merkezi bölgelerde lokalize olup erken dönemde lenf nodu metastazları yaparlar. Bu kanserler, küçük, oval yada yuvarlak şekilli, az miktarda stoplazmaya ve hiperkromatik nükleusa sahip mitoz oranı yüksek olan hücrelerden oluşurlar. Geniş alanlara infiltrasyon yapma özellikleri nedeniyle nadiren cerrahi operasyonla uzaklaştırılabilecek durumda yakalanabilirler.

Yassı epitel hücreli karsinom: Genellikle büyük bronşların merkezinde ortaya çıkan yassı hücreli karsinomda erkeklerde kadınlardan daha sık gözlenir. Sigara tüketimi, yassı hücreli karsinom gelişiminde çok önemli bir faktördür. Bölgesel lenf nodlarına yayılımı kolay olmasına rağmen göğüs boşluğu dışına yayılımı diğer akciğer kanseri tiplerine göre daha geç gerçekleşir. Bu histolojik alt gruba ait tümör kısa sürede bronş lümenini kapatarak ateletazi ve enfeksiyonlara neden olur. Bu tip tümörler metastaz yapmadan önce bronşları kapatmak yoluyla semptomlar verdiklerinden tanı anında cerrahi olarak uzaklaştırılabilir durumdadırlar ve diğer tümör tiplerine göre nisbeten iyi prognoza sahiptirler.

Adenokarsinom: Erkek ve kadınlarda görülme sıklığı hemen hemen eşit olup, sigara tüketimi ile ilişkisi, yassı hücreli karsinoma göre daha azdır. Yassı hücreli karsinomlar gibi merkezi bölgelerde görülebilmelerine rağmen, çoğunlukla akciğerin periferik bölgelerinde oluşurlar. Genellikle musin salgılayan küboidal veya silindirik şekilli neoplastik hücreler içerirler. Yavaş büyüme özelliğine sahip olan ve daha küçük kitleler yapan bu tümörler diğer histolojik tiplere göre daha erken evrede metastaz yaparlar.

Büyük hücreli karsinom: Kadınlarda ve erkeklerde görülme sıklığı hemen hemen aynı olup olguların % 40'ı sigara kullanımı ile ilişkilendirilmektedir. Bu tümörler genellikle periferik yerleşimli olup geniş kitleler oluştururlar, erken dönemde uzak bölgelere metastaz yapma yeteneğine sahip olmalarından dolayı kötü prognozluurlar. Veziküler nükleusa sahip anaplastik ve hücrel farklılaşma özelliğine sahip olmayan hücreler içerirler. Tanı sırasında olguların % 25'inde beyin metastazı bulunmaktadır (2,4).



Şekil 2.1. Akciğer kanseri histolojik alt tiplerinin Hematoksilen-Eozin ile boyama görünüşleri (86).

2.4 Akciğer Kanseri Gelişiminde Etkili Faktörler

2.4.1 Akciğer Kanseri ve Çevresel Ajanlar

1950 yılından günümüze kadar yapılan epidemiyolojik çalışmalar sigara kullanımının akciğer kanseri gelişimindeki rolünü ortaya koymuştur. 20. Yüzyılın başında akciğer kanseri nadir bir hastalık olarak bilinmesine rağmen yeni etiyolojik ajanlarla muamelenin artması ve ömür uzunluğunun artışı akciğer kanserini daha yaygın hale getirmiştir. Gelişmiş toplumlarda akciğer kanseri histolojik karakteristikleri de son yıllarda değişiklik göstermiştir. 1970'li yıllardan önce yassı epitel hücreli karsinom yaygınken bu yıllardan sonra adenokarsinom daha yaygın hale gelmiştir. Bu değişimin sigara kullanım davranışındaki değişimler ve sigara içeriğindeki değişiklikler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. 1930'lardan itibaren akciğer kanseri erkekler arasında daha yaygın görülmeye başlamıştır. Ancak kadınlar arasında akciğer kanseri görülme sıklığının artması 1960 yılından sonraki dönemde gözlenmiştir. Akciğer kanserinin coğrafik dağılımına bakıldığında kuzey Amerika ve Avrupa gibi gelişmiş toplumlarda daha yaygın olarak gözlenirken güney Amerika ve Afrika gibi gelişmekte olan toplumlarda daha nadir gözlenmektedir. Yüzyıllardır dünyanın pek çok bölgesinde tütün yaygın olarak kullanılmasına rağmen akciğer kanserinin günümüzdeki yaygınlaşması ilave maddeler içeren ticari sigaraların kullanıma girmesinin ardından gerçekleşmiştir (5).

Sigara içerisinde 4000 den fazla kimyasal materyal bulunmaktadır. Ve bunların yaklaşık olarak 200 tanesi karsinogenik özelliklere sahiptir. Sigara içen ve içmeyen kişiler arasında yapılan hasta-kontrol çalışmaları sigara kullanımının akciğer kanseri geliştirme riski ile ilişki olduğunu göstermiştir. Pasif içicilik olarak bilinen sigara içmeyen bireylerin dolaylı olarak sigara dumanına maruz kalmasının da akciğer

kanserine neden olduğu gösterilmiştir. Pasif içiciliğin akciğer kanseri riskini artırdığı ilk kez 1981 yılında yayınlanmış olan sigara içen erkeklerle evli ve sigara kullanmayan kadınlar üzerine yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir (5). Kanser genetiği alanındaki bilgilerimizin artması özel ajanlarla muamele ve spesifik genlerde meydana gelen değişimler arasında daha net bilgiler edinmemizi sağlamıştır. Sigara içeriğinde bulunan Benzo(a)pyren diol epoksitler ve diğer polisiklik aromatik hidrokarbon diol epoksitler, DNA'da meydana gelen mutasyonların en önemli sorumlularıdır (6).

Günümüzde sigara kullanımının akciğer kanserlerinin %90'ından sorumlu olduğu kabul edilmektedir. Sigara içenler sigara içmeyenlerden 20 kat daha fazla akciğer kanseri riskine sahiptirler. Akciğer kanseri geliştirme riski sigara kullanım süresinin uzunluğu ile ve bir gün içerisinde tüketilen sigara sayısı ile de koreledir. Sigarayı bırakmanın akciğer kanseri riskini azalttığı belirlenmiştir. Sigara kullanımını bıraktıktan 12 yıl sonra bu bireylerin akciğer kanseri geliştirme riski sigara kullanmayanlarla eşit hale gelebilmektedir. Ancak günde 20 sigaradan fazla içen ağır içici bireyler sigara kullanımını bıraksalar bile akciğer kanseri geliştirme riskleri asla sigara kullanmayanların seviyesine düşmez (2,5).

Yapılan çalışmalar sigara içen bireylerde belirli gen bölgelerinde heterozigosite kaybı (LOH) görülme sıklığının sigara içmeyen bireylere göre oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Bu tip sigara içimine bağlı genetik değişimlerin birikiminin karsinogenezise neden olduğu düşünülmektedir. *K-ras* geni mutasyonlarının sigara kullanımı ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla defalarca gösterilmiştir (6). Ayrıca *p53* genindeki mutasyonlar, sigara kullananlarda kullanmayanlardan daha yüksek oranda görülmektedir (6).

Akciğer kanserlerinin %9-15'inden ise diğer çevresel karsinogenler sorumludur. Populasyon temelli hasta kontrol çalışmaları gemi inşa endüstrisinde çalışan insanların akciğer kanseri gelişimi için yüksek riske sahip olduklarını göstermiştir. İş yerinde asbest tozuna maruz kalan işçilerin ilk maruziyetden 30-35 yıl sonra diğer insanlardan 10 kat daha fazla akciğer kanseri gelişimi riskine sahip olduğu belirlenmiştir. Sigara kullanımı ve asbest maruziyeti birlikteliği sinerjistik etki göstermektedir. Ayrıca yüksek derecede iyonize radyasyona maruz kalmış bireylerde akciğer kanseri görülme sıklığının artmış olduğu belirlenmiştir. Madenlerde çalışan ve yüksek miktarda radon gazına maruz kalan işçilerin akciğer kanseri riskinin arttığı gözlenmiştir. Radon maruziyeti ve sigara kullanımı da sinerjistik olarak etki göstermektedir. Açık mekanlardaki hava kirliliği ise sadece %1'inden sorumlu tutulmaktadır. Fosil yakıtların yakılması sonucu oluşan polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nikel ve kromium nedeniyle oluşan atmosferik hava kirliliğininde akciğer kanseri gelişiminde rolü olduğu düşünülmektedir (2,5).

2.4.2 Akciğer Kanseri Gelişiminde Etkili Endojen Faktörler

Bugüne kadar akciğer kanseri gelişiminde yatkınlığa neden olan herhangi bir spesifik genetik lokus tanımlanabilmiş değildir. Ancak giderek artan bilgiler, akciğer kanseri geliştirme riskinin belirlenmesinde genetik yatkınlığın önemli rol oynadığını göstermektedir. Örneğin ailesinde akciğer kanserli bir birey olan kişilerin akciğer kanserine yakalanma riski diğer insanlardan iki kat daha fazladır. 17p kromozom

bölgesinde bulunan *p53* genindeki mutasyonlar ile ortaya çıkan Li-Fraumeni sendromunda akciğer kanseri sıklıkla gözlenmektedir. Li-Fraumeni sendromunda sigara kullanmayan 45 yaşından genç bireylerde bile akciğer kanseri ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca deneysel çalışmalarla *p53* eksprese etmeyen yada mutant *p53* proteini taşıyan farelerin akciğer kanseri geliştirdiği belirlenmiştir. Bu bulgular akciğer kanseri gelişiminde *p53* geninin önemli role sahip olduğunu göstermektedir. Buna ilaveten tümör süpresör geni olan retinoblastoma'nın (*RBI*) inaktive edici mutasyonları sonucunda çift taraflı retinoblastoma gözlenen hastaların *RBI* mutasyonu taşıyıcısı olan yakınlarında akciğer kanserinin sıklıkla görüldüğü bilinmektedir (7).

Sigara kullanan bireylerin bir kısmında kanser gelişirken bir diğer kısmında gelişmemesi bireyler arasındaki genetik farklılıkların kansere yatkınlıkta rolü olduğunu düşündürmüştür. Sigara içinde yer alan karsinojenik ajanlar sitokrom p450 sisteminde bulunan faz 1 enzimleri tarafından metabolik aktivasyona uğratarak ve böylece DNA'ya bağlanarak genetik hasarlar oluşturan reaktif ara ürünler oluştururlar. Bu sistemde görev alan Cytochrome P450, Subfamily 1A, Polipeptid 1 (CYP1A1) ve Cytochrome P450, Subfamily 2D, Polipeptid 6 (CYP2D6) enzimlerini, Faz II enzimi olan Glutasyon S-Transferaz (GST) enzimini ve DNA tamir mekanizmasında görev yapan X-Ray Repair, Complementing Defective, in Chinese Hamster, 1(XRCC1) proteinlerini kodlayan genlerde belirlenen polimorfizmlerin akciğer kanser riski ile ilişki olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (5).

2.5 Akciğer Kanselerinde Çok Basamaklı Karsinojenez

En son yayınlanmış olan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) akciğer kanseri sınıflaması, küçük hücreli karsinom, yassı epitel hücreli karsinom, adenokarsinom (bronkoalveolar karsinom) ve büyük hücreli akciğer kanserlerine ilaveten invaziv akciğer kanserlerinin gelişimine neden olan üç tip kanser öncülü lezyon tanımlamaktadır. Bunlar; squamös displazi, atipik adenomatöz hiperplazi (AAH) ve difüz idiyopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi olarak tanımlanmıştır (8). Ayrıca, 2003 yılında Ullman ve arkadaşları adenokarsinomun preneoplastik lezyonu olarak bronşiyal kolumnar hücre displazisi (BCCD)'nin histolojik ve sitolojik özelliklerini tanımlamışlardır. Bu dokulardan aldıkları genetik materyal üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucunda BCCD ve adenokarsinomun erken evrelerinde gözlenen genetik değişimlerin büyük ölçüde örtüştüğünü belirlemişlerdir (9). AAH, adenokarsinom ve bronkoalveolar karsinomun (BAC) öncülü olan lezyonlar olarak tanımlanmaktadır. Akciğer adenokarsinomu nedeniyle opere edilen hastaların % 40'ından fazlasında AAH özelliklerine sahip alanlar gözlendiği bildirilmektedir. Akciğer kanserine neden olan prekanseröz lezyonlarda, malign transformasyona neden olan çeşitli genlerin ekspresyonunda ve kromozomların yapısında değişimler gözlenmektedir (8). Yamasaki ve arkadaşları AAH ve BAC'ın örtüşen genetik değişimlere sahip olduklarını ve ayrıca kanser öncülü lezyonlardan kanserleşme aşamasına geçiş sırasında genetik değişimlerin birikmesi yoluyla çok aşamalı bir karsinojenezin meydana geldiğini göstermişlerdir (10). Bu bulgular çok iyi bir biçimde tanımlanmış olan kolon kanserlerinde olduğu gibi akciğer kanserlerinin de çok basamaklı karsinojenez yolunu izlediğini göstermektedir.

2.6 Küçük Hücreli Akciğer Kanserlerinde (SCLC) Gözlenen Genetik Değişimler

Küçük hücreli akciğer kanseri dokularında yapılmış olan çalışmalar olguların % 90'ında 3p, 4p, 5q, 16q, 13q, 17p ve 3p kromozom bölgelerinde kayıpların bulunduğunu göstermiştir. Küçük hücreli akciğer kanserlerinin % 85'inde gastrin releasing peptid neuromedin B ve bunların reseptörü olan bombesin reseptörünün 3 alt tipinden en az biri eksprese edilmektedir. Bu peptidlerin salınımı ve reseptörlerine bağlanması otokrin bir büyüme halkası oluşmasına neden olmaktadır. Aynı biçimde SCLC olgularının yaklaşık olarak % 70'inde c-kit reseptörünün aşırı ekspresyonu görülmektedir. Bu reseptöre bağlanarak onu aktive eden ligand da yine SCLC tümör hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Ayrıca SCLC olgularının % 10'unda *c-kit* geninde mutasyona rastlanmaktadır. SCLC tümör dokularında gözlenen bir diğer değişim, olguların %10-35'inde gözlenen *c-myc* geni aşırı ekspresyonu olup bu aşırı ekspresyonun gen amplifikasyonu sonucunda meydana geldiği bilinmektedir. SCLC'de sıklıkla gözlenen diğer değişimler ise *p53* ve *RBI* mutasyonları ile *PTEN* lokusundaki heterozigosite kayıplarıdır (11).

2.7 Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserlerinde Gözlenen Genetik Değişimler

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri klinik olarak fark edilir hale geldiğinde pek çok gende değişimler barındırmaktadır. Akciğer kanserlerinde son yapılan çalışmalar tümör başına en az 20'den fazla genetik ve epigenetik değişim gözlendiğini göstermektedir. Bunlar; DNA dizi değişimleri, gen kopya sayısı değişimleri ve promotor metilasyonunun değişimi şeklinde olabilmektedirler.

2.7.1 Kopya Sayısı Değişimleri ve Heterozigosite Kayıpları

NSCLC'de yapılan sitogenetik incelemeler pek çok farklı klonal karyotipik değişimin varlığını göstermiştir. NSCLC'de yapılan araştırmalar 3p, 6q, 8p, 9p, 9q, 13q, 17p, 18q, 19p, 21q ve 22q kromozomal bölgelerinin artışları ile, 1p, 1q, 3q,5p, 7p, 7q, 11q ve 12q kromozomal bölgelerin kayıplarının bu kanser tipinde yaygın biçimde varlığını göstermiştir. Diğer solid tümörlerde olduğu gibi akciğer kanserlerinde de heterozigosite kaybı yaygın olarak görülen bir genetik değişimdir. NSCLC'de 3p'de heterozigosite kayıpları hastaların %50'sinde gözlenmekte olup hastalığın erken evrelerinde ortaya çıkmaktadır. 3p25-26, 3p24, 3p21.3 ve 3p14.2 ve 3p12 gibi farklı delesyon bölgelerinin bulunması 3 numaralı kromozomun kısa kolunda birden fazla tümör süpresör gen bulunduğunu göstermektedir. 3 nolu kromozomun bu bölgesinde beta retinoik asit reseptör geni, protein-tirozin fosfataz gama, semaphorin IV ve A(V) genleri, von Hippel-Lindau tümör süpresör geni, Frajl Histidin Triad (*FHIT*), Ras Association Domain Family Protein 1 (*RASSF1A*) gibi akciğer kanseri gelişiminde rol oynadığı düşünülen aday genler tanımlanmıştır. (7,12). Akciğer kanserlerinin NSCLC tipinde % 50 sıklıkla gözlenen diğer bir heterozigosite kaybı ise 17p13.1 kromozomal bölgesindedir. NSCLC tanılı olguların yaklaşık olarak %15'inde ise *RBI* genini içeren 13q14 kromozomal bölgesinde LOH gözlenmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda, 3p, 9p ve 17p kromozom bölgelerinde heterozigosite kayıplarının NSCLC'ın erken evrelerinde ve prekanseröz lezyonlarda da belirlenmiş olması bu genetik değişimlerin çok basamaklı karsinogenezin erken basamaklarında meydana geldiğini göstermektedir (7).

2.7.2 Tümör Süpresör Gen Değişimleri

2.7.2.1 P53 gen değişimleri

17p13.1 kromozom bölgesinde lokalize olan *p53* geninden sentezlenen *p53* proteini DNA tamiri, apoptozis, ve hücre döngüsü kontrol noktalarında işe karışan çeşitli proteinlerin ekspresyonunu kontrol eden nükleer bir transkripsiyon faktörüdür (12). Normal *p53* proteini DNA hasarına sahip hücrelerde, *p21* proteinini aktive ederek Rb'nin defosforilasyonuna neden olmakta ve hücre döngüsünün G1-S kontrol noktasında durdurulmasını ve hasarın tamir edilemediği durumda hücrenin apoptoza gitmesini sağlamaktadır. Akciğer kanserlerinde en iyi tanımlanmış olan tümör süpresör gen değişimi *p53* mutasyonları olup %50-70'inde belirlenebilmektedir. Mutant *p53* proteini *p21* proteinini aktive etme yeteneğini kaybettiği için hücrelerin G1-S kontrol noktasında durdurulması işlevini yerine getirememektedir. Mutant *p53* proteininin hücre içindeki yıkım süresi normal *p53* proteinlerinden daha uzun olduğu için tümör hücrelerinde birikim yapmaktadır (13). Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde belirlenmiş olan *p53* geni mutasyonlarının çok büyük bir kısmı genin *p53* proteininin DNA bağlama altbirimini kodlayan 4. ve 10. ekzonları arasında kalan kodlayıcı bölgeler ve ekzon intron sınırlarında meydana gelmektedir. Bu mutasyonların çoğu transisyon, transversiyon ve delesyon/insersiyon tipi mutasyonlar olup özellikle genin 157. kodonu akciğer kanseri için mutasyonel bir hotspot bölgedir. Sigara içen ve içmeyen bireyler arasında *p53* mutasyonlarının sıklığı karşılaştırıldığında, sigara içen NSCLC tanılı hastalarda *p53* geni mutasyonlarının, sigara içmeyen hastalara göre daha sık gözleendiği belirlenmiştir. En yaygın olarak gözlenen mutasyonlar transversiyon tipi nokta mutasyonlar olup, sigaranın içerisinde bulunan kimyasal moleküllerden kaynaklanan DNA adduct'ları sonucunda oluşmaktadır. *p53* mutasyonlarının premalignant lezyonlarda da saptanmış olması bu genetik değişimlerin akciğer karsinogenezinin erken basamaklarında meydana geldiğini göstermektedir (12,14).

2.7.2.2 RB1 geni değişimleri

13q14.3 kromozom bölgesinde bulunan *RB1* geni, G1 tipi siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK) ile etkileşimi ile hücrelerin hücre döngüsüne girmelerini kontrol eden nükleer bir siklin dependent kinaz inhibitörünü olan RB1 proteinini kodlamaktadır. RB1 proteini defosforile olduğunda E2F transkripsiyon faktörüne bağlanarak G1/S geçişini baskılar. RB1'nin siklin E/CDK2 kompleksi tarafından fosforilasyonu E2F'in salınımını ve aktivasyonunu sağlar. E2F aktive olduğunda hücrenin S fazına geçmesini sağlayan genlerin ekspresyonu başlatılır. Bu genin homozigot delesyonları, transkripsiyon başlama bölgesinin anormal metilasyonu ile transkripsiyonel olarak sessizleştirilmesi ve *RB1* geninde nokta mutasyonları NSCLC'de yaygın olarak gözlenen değişimlerdir. Bu değişimler akciğer kanserinin erken evrelerinde ortaya çıkan değişimlerdir (15).

2.7.2.3 P16 Gen değişimleri

NSCLC'de sıklıkla *p16/Rb* yolağında görev yapan proteinlerin regülasyonunun bozulduğu belirlenmiştir. Rb yolağında görev alan önemli bir tümör süpresör olan *p16* proteini, 9p21 kromozom bölgesinde lokalize olan *CDKN2a/p16 (INK4a)* geni tarafından sentezlenmektedir. NSCLC'li hastalarda yapılan incelemeler genin promotor bölgesindeki ve 1. ekzonunda bulunan CpG adacıklarının metilasyonu ya da *INK4a* lokusunun homozigot delesyonuna bağlı olarak tümör dokularında *p16*

proteini ekspresyon kaybının bu tümör tipinde yaygın bir değişim olduğunu göstermiştir (16).

2.7.2.4 Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (*PTEN*)

Geni Değişimleri

PTEN proteini, hücrelerin canlılığının devam etmesini sağlayan Fosfotidil Inozitol 3 Kinaz (PI3K)/Akt yolağının negatif regülatörü olarak görev yapan bir proteindir. Bu proteini kodlayan gen 10q23 kromozom bölgesinde lokalizedir. Substratlarındaki tirozin ve serin/treonin amino asitlerini defosforile eden *PTEN* proteininin en önemli substratı PI3K'ın ürünü olan Fosfotidil Inozitol 3 Fosfatadır (PIP-3). Akciğer kanserleri dahil olmak üzere pek çok kanser türünde *PTEN* geni değişimlerinin varlığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar *PTEN* protein ekspresyonu kaybının sitoplazmada PIP-3 konsantrasyonuna ve buna bağlı olarak Akt aktivitesinin artmasına neden olduğunu göstermiştir. *PTEN* ekspresyon kaybı sonucunda Akt yolağının sürekli aktif olarak çalışması hücrelerin canlı kalmasına ve kontrolsüz çoğalmasına neden olmaktadır. Tümör hücrelerinde gözlenen *PTEN* ekspresyon kaybının delesyon, heterozigozite kaybı ve promotör metilasyonu gibi farklı mekanizmalar ile sağlanabildiği gösterilmiştir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dokularında *PTEN* protein ekspresyonunun immünohistokimyasal yöntemler ile incelenmesi sonucunda olguların % 24-46'sında *PTEN* protein ekspresyonunda azalma belirlenmiştir. *PTEN* ekspresyonuna bağlı olarak küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarının 5 yıllık sağkalım değerleri incelendiğinde *PTEN* ekspresyonunda azalma görülen olguların sağkalım sürelerinin de kısaldığı belirlenmiştir. Gen ekspresyonunda azalma olmaksızın nadiren de olsa küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olgularında *PTEN* geni mutasyonlarının da gözlenebildiği bildirilmiştir (17-19).

2.7.3 Onkogenlerde Meydana Gelen Değişimler

2.7.3.1 *K-ras* Geni Mutasyonları

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin %18-30'unda 12p11.2 kromozom bölgesinde lokalize olan *K-ras* geninin mutasyona uğradığı belirlenmiştir. 12, 13 ve 61. kodonda meydana gelen bu mutasyonlar özellikle adenokarsinom alt tipinde diğer tiplere göre daha sık olarak gözlenmektedir. Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde en sık görülen *K-ras* gen mutasyonu 1. ekzonun 12. kodonunda meydana gelen GGT,Gly-GTT,Val mutasyonudur. Yapılan çalışmalar *K-ras* kodon 12 mutasyonlarının genellikle sigara içerisinde bulunan nitrozaminler ve polisiklik hidrokarbonlar tarafından oluşturulduğunu göstermiştir. Mutant *K-ras* geni sürekli olarak aktif durumda bulunan ras proteinlerini kodlayarak hücrelerin çoğalmasını sağlayan hücresel yolların aktive edilmesine neden olmaktadır. *K-ras* geni mutasyonları ve hastaların sağkalım süreleri açısından olgular değerlendirildiklerinde yabanıl tip *K-ras* genine sahip olguların sağkalım sürelerinin mutant *K-ras* genine sahip olgulara göre daha uzun olduğu gösterilmiştir (13,20-22).

2.7.3.2 *Myc* gen değişimleri

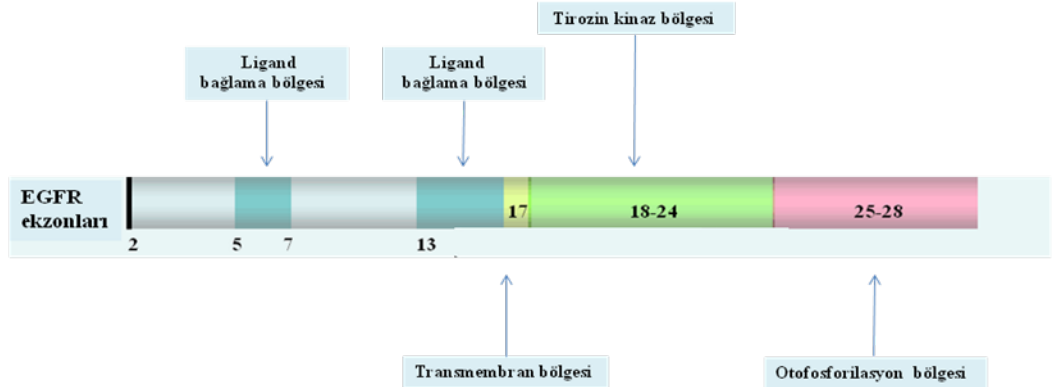
Myc proto-onkogen ailesi, basic helix loop helix leucine-zipper sınıfına ait nükleer transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadırlar. Bu transkripsiyon faktörleri, hücre döngüsü kontrolü, RNA metabolizması, ve DNA sentezinde işe karışan genlerin direk aktivasyonu yoluyla hücre büyümesini kontrol etmektedirler. Bu gen

ailesi *c-myc*, *N-myc* ve *L-myc* genlerini içermektedir. Bu genlerden 8q24 kromozom bölgesinde lokalize olan *c-myc* geninin küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin yaklaşık olarak %10'unda aşırı eksprese edildiği ve bu ekspresyon artışının gen amplifikasyonu yoluyla gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olgularında gözlenen *c-myc* gen ekspresyon artışının klinik önemine dair herhangi bir veri bulunmamaktadır (12,13).

Akciğer kanseri dokularında yapılan incelemeler büyüme faktörlerinin hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerine bağlanması sonucunda aktive olan hücresel yolların bu kanser tiplerinin ortaya çıkmasında önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Bu sinyal yollarının en önemlisi Epidermal Growth Faktör Reseptör (EGFR) sinyal iletim yolağıdır.

2.8 EGFR Sinyal İletim Yolağı

EGFR proteini, 7p12 kromozom bölgesinde bulunan ve 28 ekzon içeren *EGFR* geni tarafından sentezlenen 1186 amino asitten oluşan 170 kDa büyüklüğünde transmembran bir glikoproteindir. Ligandların tanınması ve bağlanmasını sağlayan bir ekstraselüler altbirim, hidrofobik özelliğe sahip membran içinde diğer reseptörlerle ilişkileri sağlayan bir transmembran alt birim ve *EGFR* geninin 18. ile 24. ekzonlarınca kodlanan protein tirozin kinaz aktivitesine sahip bir intraselüler altbirimden oluşmaktadır (23). EGFR proteininin bölgeleri Şekil 2.2'de görülebilir. EGFR süper ailesi 4 farklı, birbiri ile ilişkili transmembran reseptörden oluşmaktadır. Bu reseptörler EGFR/erbB1, HER2/erbB2, HER3/erbB3, ve HER4/erbB4'dür. Bu reseptörler özellikle ekstraselüler ve transmembran alt birimlerinde yapısal olarak yüksek oranda homoloji göstermektedirler (24).



Şekil 2.2. EGFR ekzonları ve kodladığı protein bölgeleri.

EGFR proteini epitelyal hücrelerin yüzeyinde eksprese edilmekte olup pankreas, mesane, prostat, ovaryum, glioma, meme, akciğer, renal, baş ve boyun kanserleri ve kolorektal kanserler gibi pek çok solid tümörde aşırı ekspresyonu gözlenmektedir (25). EGFR sinyal iletim yolağı, akciğer kanserinin gelişmesinde işe karışan hücrel yolakların en önemlilerinden birisidir. EGFR’i aktive ettiği bilinen ligandlar; EGF, TGF- α , heparin binding EGF-like büyüme faktörü, amphiregülin, betacellulin ve epiregülin’dir. Ligandın reseptöre bağlanması reseptörün dimerizasyon bölgesinin açığa çıkması ile sonuçlanan bir konformasyonel değişime neden olmaktadır. Dimerizasyon domaininin açığa çıkması sonucunda EGFR proteinleri birbirleri ile homodimerizasyona ya da diğer reseptörler ile heterodimerizasyona uğramaktadır (26). EGFR proteini tercihen meme kanserlerinde prognostik bir belirteç olarak kullanılmakta olan Her2 proteini ile dimerizasyon yapmaktadır (27). Dimerizasyon, sitoplazmik altbirimde yer alan özgül tirozin amino asitlerinin otofosforilasyonunu sağlayan Tirozin kinaz (TK) altbirimini aktive etmektedir. Bu fosforillenmiş tirozin amino asitleri, gen transkripsiyonunu kontrol eden hücrel yolakları aktive eden adaptör proteinlerin bağlanması için bağlanma noktaları olarak görev yapmaktadır (28).

EGFR aracılığı ile aktive olan 3 hücrel yolak tanımlanmıştır, bu yollar; Ras/Raf/Mitogen activated protein (MAP) kinaz, Jak2/STAT3 ve PI3K/Akt yollarıdır (Şekil 2.3). Bu yolların aktivasyonu hücre proliferasyonu, tümör invazyonu, metastaz, antiapoptotik sinyal iletimi, kemoterapiye direnç, anjiyogenez ve hücre hücre bağlantılarının kurulması ile ilişkili hücrel aktiviteleri tetiklemektedir (26).

2.8.1 Ras/RAF/MAPK Yolağı

EGFR transotofosforilasyonu, V-Src avian sarkoma viral onkogen (src2), büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2 (Grb2), SH3 ve Son of Sevenless (SOS) gibi sinyal transdüksiyon moleküllerinin bu reseptör ile kompleks kurmasını sağlamaktadır. Otofosforilasyonla aktive olan EGFR, Grb2 adaptör proteininin SH2 domainine bağlanır. Grb2 proteini ise, SH3 domaini aracılığı ile SOS proteinine bağlıdır. Dolayısı ile EGFR aktivasyonu SOS proteininin plazma membranına toplanmasını sağlar. Membrana göçen SOS proteini, farnezilasyon ile plazma membranına yönlendirilmiş olan Ras proteini ile kompleks oluşturmaktadır. Ras proteininin aktivasyonu sonucunda serin treonin kinaz RAF, mitogen activated protein kinase 1 ve 2 (MAPK), ERK 1ve 2 yolağının aktive olmasına neden olmaktadır. Bu yolağın aktive olması hücrelerin hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçmesi için gerekli olan siklin D1 ‘i de içeren pek çok nüklear proteini aktive etmektedir (29).

2.8.2 Signal Transduction and Activator of Transcription (STAT)Yolağı

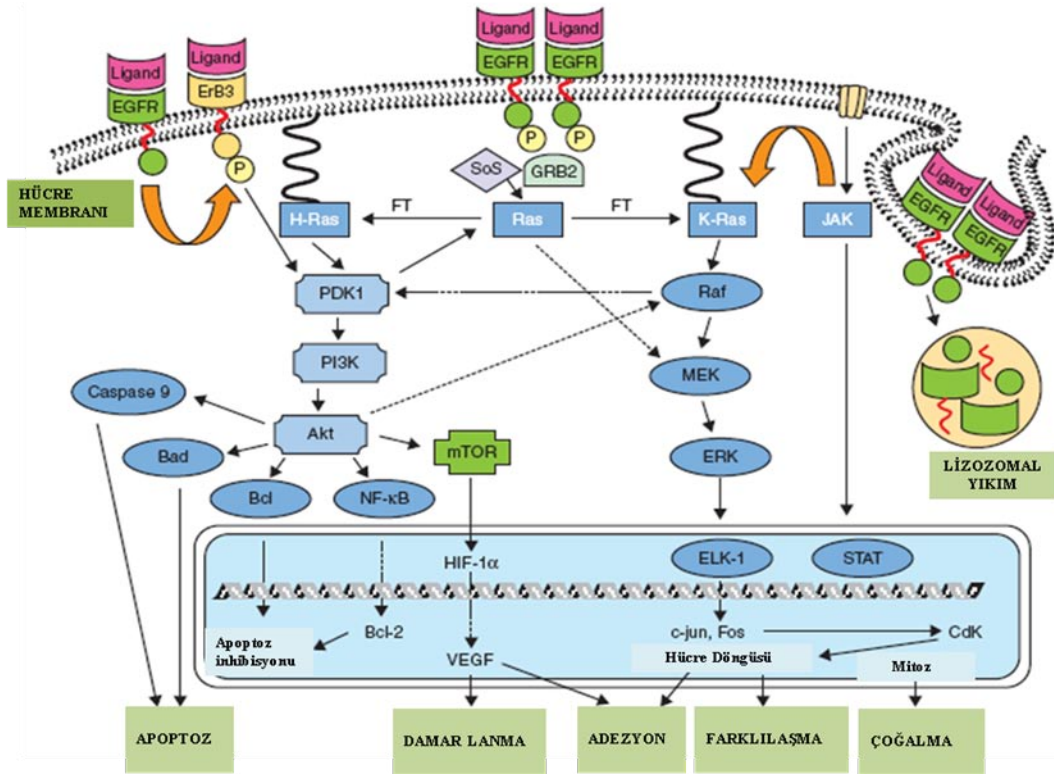
EGFR proteini tarafından aktive edilen ikinci sinyal yolağı STAT yolağıdır. STAT protein ailesi hücre membranında bulunan reseptörlerce oluşturulan sinyalleri hücre çekirdeğine taşıyan ve DNA’ya bağlanarak pek çok genin ekspresyonunu kontrol eden 7 protein içermektedir (STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b ve 6). STAT proteinleri tetramerizasyon domaini, coil-coil domaini, DNA bağlama domaini, linker domain, Src homoloji (SH)2 domaini, C terminal bölgede korunmuş Tirozin amino asidi ve C-terminalde transaktivasyon domininden oluşmaktadır. Büyüme faktörlerince

uyarılmamış olan hücrelerde STAT proteinleri N-terminal uçlarından birbirine bağlanmış olan dimerler halinde sitoplazmada lokalizedirler. STAT proteinleri SH2 domainleri aracılığıyla reseptör komplekslerindeki fosfotirozin bölgelerine bağlanarak bu bölgelerde toplanmaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan epidermal growth faktör reseptörünün aktivasyonu STAT3 proteinini 705. pozisyonunda bulunan tirozin amino asidinden fosforilleyen reseptör ilişkili tirozin kinazları aktive etmektedir. Aktive olan STAT proteinleri dimerize olarak çekirdeğe transfer olmaktadır. Nükleusa transfer olan STAT proteinleri farklı genlerin promotör dizilerine bağlanarak bu genlerin ekspresyonunu kontrol etmektedir. STAT3 apoptoz inhibitörleri (Bcl-XL, Mcl-1), hücre döngüsünü kontrol eden proteinler (Siklin D1, c-Myc) ve anjiyogenez uyarıcısı olan VEGF proteinlerinin ekspresyonunu artırarak onkogeneze rol oynamaktadır (30, 31).

2.8.3 Fosfotidil Inozitol 3- Kinaz (PI3-K)/Akt Yolağı

EGFR aracılığı ile aktive edilen diğer bir yolak ise PI3-K/Akt yolağıdır. PI3K bir katalitik alt birim (p110) ve bir adet adaptör/regülatör altbirimden (p85) oluşan heterodimerik bir proteindir. PI3-K aktivasyonu hem tirozin kinaz reseptör kinazlar hem de sitoplazmik tirozin kinazlarla aktivasyon yoluyla gerçekleştirilebilmektedir. Aktive olan PI3-K, Fosfotidil Inozitol (4,5) Bifosfatı (PIP2) inozitol halkasının C3 pozisyonundan fosforile ederek Fosfotidil Inozitol (3,4,5) Trifosfata (PIP3) dönüştürmektedir. Fosfataz ve tensin homolog (PTEN) sitoplazmada PIP3'ün PIP2'ye dönüştürülmesini sağlayan bir protein olup PI3-K/Akt yolağının inhibisyonunu sağlayan önemli bir proteindir. Serin/threonin kinaz olan Akt proteinini Plekstrin homoloji domainleri aracılığı ile PIP3'e bağlanmaktadır. 3' fosfoinositid bağımlı kinaz 1 (PDK1) tarafından Ser473 ve Thr308 pozisyonlarından fosforilasyonu sonucunda Akt aktive olmaktadır. Aktive olan Akt, apoptozu engelleyen pek çok substratı fosforile ederek aktivasyon göstermektedir. Akt tarafından proapoptotik Bcl2 ailesi üyesi olan BAD proteininin Ser136 pozisyonundan fosforilasyonu, bu proteinin antiapoptotik Bcl2 ailesi üyesi proteinlerle ilişki kurmasını engelleyerek mitokondriden sitokrom c salınımını ve dolayısıyla apoptozu engellemektedir. Akt tarafından kaspaz 9'un Ser196 pozisyonundan fosforilasyonu ise proteinin konformasyonel değişimine neden olarak proteolitik aktivitesini engellemekte ve böylece apoptozu baskılamaktadır. Forkhead transkripsiyon faktörü 1 (FKHRL1)'in Akt tarafından fosforilasyonu, bu transkripsiyon faktörünü inaktif hale getirerek apoptozda rol oynayan Fas ligand, Bim, IGFBP1 ve Puma gibi proteinlerin ekspresyonunu engellemektedir. Siklik AMP-response-element-binding protein (CREB)'in Akt tarafından fosforilasyonu, Bcl2 ve Mcl-1 gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunun artmasına neden olarak hücrelerin apoptoza gitmesini engellemektedir. Ayrıca p53 proteininin degradasyonunu uyan MDM2 proteininin Akt aracılı fosforilasyonu, bu proteinlerin nükleusa translokasyonunu ve p53e bağlanmasını artırarak apoptozu baskılamaktadır (32).

Aktive olan bu üç yolak, bir yandan hücre bölünmesi ve çoğalmasını sağlayan proteinlerin ekspresyonlarını artırarak hücre canlılığını uyarırken, diğer taraftan da mitokondriden sitokrom c salınımını kontrol ederek apoptozda önemli rol oynayan çeşitli proteinlerin ekspresyonlarını etkilemektedirler.



Şekil 2.3. EGFR sinyal iletim yolağı (87).

2.9 Apoptoz Sinyalleri

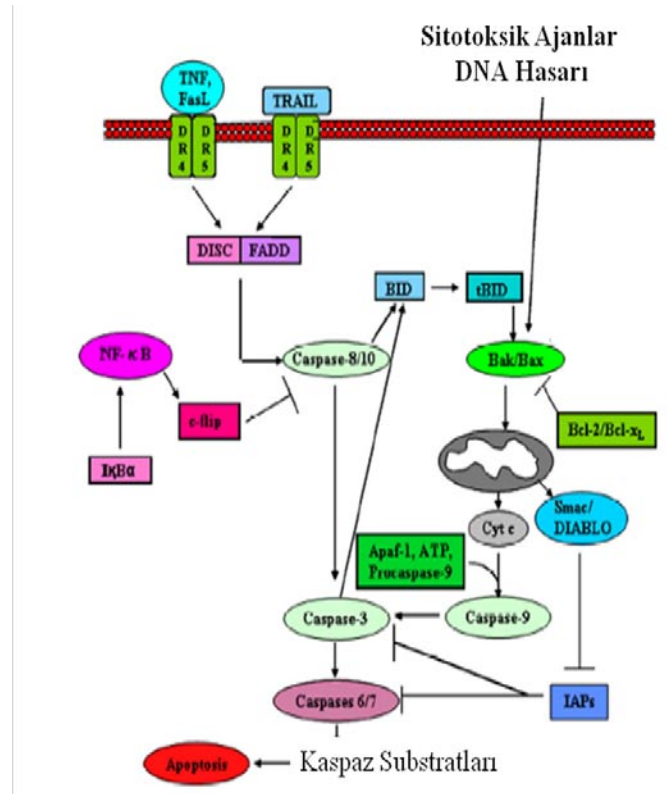
2.9.1 Ölüm Reseptörleri ile Oluşturulan Apoptoz

İmmün sistem hücreleri tarafından sentezlenen ve Tümör Nekrosis Factor (TNF)'i de içeren çeşitli ligandların hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen ölüm domaini içeren reseptörlerine bağlanması hücrelerin programlanmış hücre ölümüne uğramasına neden olmaktadır (Şekil 2.4). Ölüm domaini içeren reseptörler transmembran TNF reseptör süperailisinin üyeleri olup sitoplazmik bölgelerinde ölüm domaini bulunmasıyla karakterizedirler. Bu domain Fas ve TNF-R1de ve diğer aile üyelerinde bulunmamaktadır. Bu reseptörler sinyal iletiminde bazı ortak yolları kullansalarda tamamen özdeş değildirler. Fas, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 reseptörleri, Fas associated death domain (FADD) adaptör proteinleri ile ilişki kurarken, TNF-R1 ve DR3 reseptörleri ise TNFR associated death domain (TRADD) adaptör proteinleri ile ilişki kurmaktadır. Fas-Fas ligand bağlantısından sonra reseptörün sitoplazmik bölgesinde Fas'ın Death Domainleri (DD)'leri ile FADD'nin DD'leri bağlanmaktadır. FADD'in C terminal bölgesinde bulunan death effector domainler (DED) Kaspaz 8'de bulunan DED domainler ile ilişki kurması nedeniyle FasL-Fas, FADD ve kaspaz 8'i içeren 'death inducing signaling complex' adı verilen (DISC) bir protein kompleksi oluşmaktadır. Kaspaz 8 inaktif halde sentezlenmektedir. Bu prokaspaz 8'in kırılması ile aktif kaspaz 8 oluşmaktadır. Aktive olan kaspaz 8 ise efektör prokaspazlar olan kaspaz-3,-6 ve -7'yi keserek aktive etmektedir. Efektör kaspazlar ise hücre içinde pek çok substratı proteolitik olarak kesme yeteneğine sahip olup apoptozun belirteçlerinden olan DNA fragmentasyonunu meydana getirmektedir. TNF-R1 ile gerçekleşen sinyal iletimi, Fas reseptörünün oluşturduğu

sinyalden farklılık göstermektedir. TNF-R1, TRADD proteinleri ile ilişki kurmaktadır. TRADD proteinleri FADD üzerinde bulunan DD'ler ile ilişki kurarak yukarıda anlatıldığı gibi kaspaz 8'in aktivasyonunu sağlayabilmektedir. Ancak buna ilaveten TRAF1, TRAF2 ve RIP proteinleri ile ilişki kurarak antiapoptotik NFκB ve JNK yollarını aktive edebilmektedir (33).

2.9.2 Mitokondri Bağımlı Apoptoz

Hücre dışından gelen ölüm sinyalleri ile aktive olan kaspaz 8 enzimi mitokondri membranında bulunan Bid proteinini keserek tBid proteinine dönüştürmektedir. tBid proteini mitokondri mebranında Bak proteinlerinin oligomerize olmasını indüklemekte ve mitokodriden sitokrom c salınımını sağlamaktadırlar. Mitokondriden salınan sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1)'in oligomerizasyonunu sağlamaktadır. ATP varlığında, Apaf-1'in üzerinde yer alan kaspaz aktivasyon ve recruitment domain (CARD) aracılığıyla, kaspaz-9 ile ilişki kurmasıyla apoptozom kompleksini oluşturmaktadır. Apoptozom kompleksi ise yine diğer efektör kaspazların kesimi yoluyla apoptozu tetiklemektedir (33).



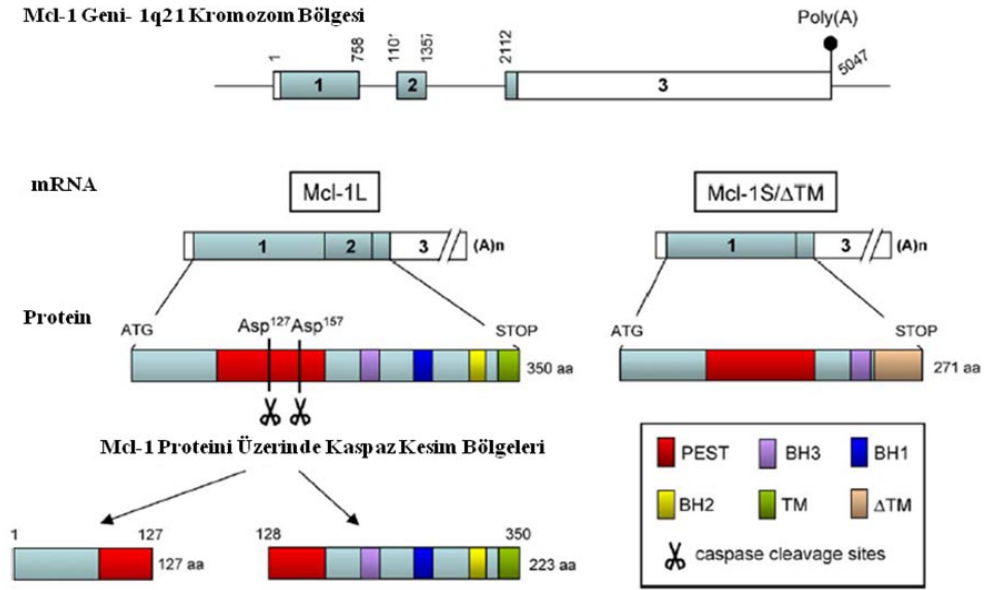
Şekil 2.4. Hüresel apoptoz yolları (86).

2.9.2.1 Bcl-2 ailesi Üyeleri ve Apoptoz

Mitokondri membranının geçirgenliği Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından sıkı bir biçimde kontrol edilmektedir. Bcl-2 ailesi fonksiyonları ve sahip oldukları Bcl-2 homoloji domainlerine bağlı olarak üç gruba ayrılmaktadır. Bax ve Bak proteinlerini içeren proapoptotik efektörler; BH1, BH2 ve BH3 domainlerine ve mitokondri membranına lokalizasyonu sağlayan C terminal transmembran segmente sahiptirler. Aktive olduklarında mitokondri membranında oligomerize olarak membran

geçirgenliğini artırmakta ve sitokrom c salınımına neden olmaktadır. Mcl-1, Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w ve A1'i içeren prosurvival proteinler; Proapoptotik proteinler ile benzer domainlere sahiptirler. Ancak diğer proteinler N-terminal kısımda BH4 domainine sahipken, Mcl-1 proteininde bu domain bulunmamaktadır. Bim, Bid, Puma, Noxa'yı içeren sadece BH3 içeren proteinler; proapoptotik Bcl-2 proteinlerini aktive ederek yada prosurvival Bcl-2 proteinlerini inaktive ederek apoptozu indüklemektedirler (34).

1q21 kromozom bölgesinde lokalize olan *Mcl-1* geni tarafından sentezlenen prosurvival Mcl-1 proteini, 350 amino asitten oluşmaktadır. Mcl-1 proteininin yapısı ilk kez 1993 yılında tanımlanmıştır. C terminal hidrofobik transmembran domain, sitozole bakan kısımda BH1, BH2 ve BH3 domainlerine sahiptir. Proteinin N-terminalinde kısa ömürlü proteinlerde bulunan 2 adet PEST dizisi (prolin, glutamik asit, serin ve treonin amino asidince zengin) bulunmaktadır (Şekil 2.5). Mitokondrinin dış membranında lokalize olup mitokondriden sitokrom c salınımını engeller. Hücre içinde Mcl-1 protein seviyesi transkripsiyonel, translasyonel ve posttranslasyonel seviyede kontrol edilmektedir. EGF ve VEGF gibi büyüme faktörlerinin membrandaki reseptörlerine bağlanarak bu reseptörleri aktive etmesi hücre içinde Ras/Raf/MAPK, Jak/STAT, PI3K/Akt yollarını aktive etmektedir. Bu yollar ise Mcl-1 mRNA'sının ekspresyonunun artmasına neden olmaktadır. Mcl-1 ekspresyonu, 3' ifade edilmeyen bölgesine mir29 mikroRNA'sının bağlanması ve ikinci ekzonun çıkarılmasına neden olan alternatif splicing mekanizmaları ile posttranskripsiyonel seviyede de kontrol edilmektedir. Alternatif splicing ile oluşturulan Mcl-1S/ Δ TM izoformunda PEST ve BH3 domainleri bulunurken BH1 ve 2 transmembran domainleri bulunmamaktadır. Mcl-1S/ Δ TM izoformunun ekspresyonu hücrenin apoptoza girmesini indüklemektedir. Mcl-1 proteininin posttranslasyonel kontrolü ubiquitin aracılı protein yıkım yolağı ile 26S proteazomlarda degrade edilerek gerçekleştirilmektedir. PEST domaini içinde yer alan Asp127 ve Asp157 bölgelerinden Kaspaz 3 enzimi aracılığı ile kesilmektedir. Ancak bu kesimin proteinin fonksiyonu ve yıkımı ile ilişkisi tam olarak aydınlatılmış değildir (34, 35). Normal hücrelerde Mcl-1, proapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerine bağlanarak bu proteinleri inaktif durumda tutmaktadır (36). Hücre içerisinde proapoptotik üyeler ile prosurvival Bcl-2 ailesi proteinlerinin birbirine oranı hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğine karar veren en önemli faktörlerden birisidir. Kanser hücrelerinde bu denge çoğunlukla antiapoptotik yönde bozulmuş durumdadır. Bunu destekleyen bir çalışmada da, cerrahi yolla elde edilen primer küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dokularının yaklaşık olarak yarısında, Mcl-1 proteininin aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir (37).



Şekil 2.5. Mcl-1 geni, mRNA'sı ve proteininin yapısı (35).

2.10 NSCLC'DE Konvensiyonel Tedavi

Akciğer kanseri tedavisinde cerrahi tedavi ilk kez 1933 yılında akciğer kanserli bir hastada yapılan ilk başarılı pnemonektomi ile uygulanmaya başlanmıştır. Bölgesel lenf nodu metastazlarının öneminin anlaşılması ile evlendirmede önemli olan cerrahi mediastinal lenf nodu örneklemesi uygulamasına geçilmiştir. 1940'li yıllarda nitrogen mustard akciğer kanseri tedavisinde kullanılan ilk kemoterapötik ajan olmuştur. Megavoltaj linear akseleratörlerin bulunması ile 1950'li yıllarda radyoterapi akciğer kanseri tedavisinde uygulanmaya başlanmıştır. Son 20 yıldır yapılan çalışmalarla, platinum temelli ikili kemoterapi uygulamalarının hastaların sağkalım sürelerini uzattığı, ayrıca, hastalığın semptomlarını hafiflettiği ve yaşam kalitesini artırdığı gösterilmiştir (38).

Bütün bu teknolojik gelişmelere rağmen akciğer kanserli hastaların 5 yıllık sağkalım ortalaması % 15'dir (24). Bunun nedenlerinden birisi olarak hastalığın genellikle ileri evrelerde tespit edilebilmesi gösterilmektedir. Günümüzde yeni tanı almış olan akciğer kanserli olguların % 75'i bölgesel ya da uzak bölgelere metastaza sahiptir. Ayrıca akciğer kanserlerinin daha erken evrelerde belirlenebilmesine olanak sağlayacak herhangi bir tarama programı bulunmamaktadır (39).

Tedavi açısından NSCLC üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar, Erken evre (cerrahi+adjuvan terapi), lokal ileri evre (kombine kemoterapi+radyoterapi) ve ileri evre (sistemik terapi) küçük hücreli olmayan akciğer kanseridir. **Erken Evre** akciğer kanserlerinin tedavisinde cisplatin temelli adjuvan kemoterapi, cerrahi tedavi uygulanmış stage II ve III küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde tedavi oranlarını arttırmak için uygulanmaktadır. Akciğer kanseri heterojen bir hastalık olduğu için hastaların uygulanan terapiye cevaplulukları da farklılık göstermektedir. Bu nedenle konvensiyonel evlendirme ve morfolojik incelemeler ile terapiye cevaplılığın öngörülmesi mümkün olmamaktadır (39). **İleri Evre Akciğer Kanseri**nde, cisplatin ya da karboplatin'in gemsitabin, paclitaksel, doketaksel ya da

vinorelbine gibi üçüncü nesil ajanlar ile kombine olarak kullanılması fit olan ileri evre NSCLC hastalarında standart terapi olmasına rağmen fit olmayan ve daha yaşlı hastalarda vinorelbine ya da gemcitabine ile tek ajan olarak tedavi yapılmaktadır (24). Platinum türevleri DNA iplikleri arasında çapraz bağlantılar oluşturarak geri dönüşümsüz olarak DNA'da hasar meydana getirerek hücrelerin proliferasyonunu engellemektedir. Platinum terapisine dirençlilik ilacın hızlı detoksifikasyonu yada ilaç tarafından DNA'da oluşturulan hasarların Endonuclease Excision Repair Cross-Complementing 1 (ERCC1) proteinini de içeren Nucleotid Eksizyon Repair (NER) sistemi tarafından etkin bir biçimde tamir edilmesi yoluyla gerçekleştirilmektedir (40).

Son yapılan çalışmalar cerrahi girişim ile elde edilen dokulardaki gen ifade profillerinin rekürrens, yaşam süresi ve terapiye cevaplılığın öngörülmesi için önemli bilgiler sağladığını öne sürmektedir. Bu proteinlerden en önemlisi ERCC1 proteindir. ERCC1 cisplatin ile indüklenmiş DNA adduct'larının tamirinde görev alan bir nükleotid eksizyon tamir enzimidir. Yapılan çalışmalarla ERCC1 eksprese etmeyen tümörlerin cisplatin temelli adjuvan terapilerden daha fazla fayda gördüğü, ERCC1 eksprese eden tümörlerin ise bu tedavilerden yarar görmediği belirlenmiştir (39). Ayrıca *ERCC1* geninde 118C polimorfizmine sahip olan hastalarda protein ekspresyon oranının daha düşük olduğu ve platin temelli tedavi aldıktan sonra bu polimorfizme sahip olmayanlardan daha uzun sağkalım süresine sahip oldukları gösterilmiştir (41). İleri evre küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin temel terapisinde sistemik kemoterapi kullanılmasına rağmen kemoterapinin etkinliğinin kısa sürede platoya erişmesi nedeniyle yeni hedeflenmiş tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalara ağırlık verilmiştir. Bu amaçla küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gelişiminde önemli rol oynayan hücresel yollar üzerinde etkin yeni moleküller geliştirilmiştir. Bu moleküller, mTOR inhibitörleri, NSCLC'de yaygın biçimde aşırı eksprese edilen EGFR proteinini hedefleyen EGFR inhibitörleri, tümör damarlanmasını engellemeyi amaçlayan VEGFR inhibitörleri, tümör gelişiminde rol oynayan proteinleri de içeren pek çok proteinin yıkıldığı proteozom komplekslerini hedefleyen proteozom inhibitörleridirler (39).

2.11 EGFR Tirozin Kinaz İnhibitörü (TKI) Temelli Hedeflenmiş Terapiler

EGFR proteini normal bronşiyal mukozada bronşiyal bazal laminaya sıkı biçimde tutunmuş olan bazal hücrelerde eksprese edilmektedir. Yapılan çalışmalar normal mukozadan epitelyal hiperplazi ve kansere geçişte EGFR ekspresyonunun kademeli olarak arttığını göstermiştir. Ayrıca düşük grade ve yüksek grade displaziler arasında da EGFR ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmektedir. NSCLC'de EGFR ekspresyonu histolojik alt tiplere göre değişiklik göstermektedir. Yassı hücreli karsinomda % 84, adenokarsinomda % 65, büyük hücreli karsinomda % 68 oranında aşırı ekspresyon gözlenirken, küçük hücreli karsinomda ise ekspresyon artışı gözlenmemektedir. Bazı çalışmalarda NSCLC'de EGFR aşırı ekspresyonunun kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu bildirilmesine rağmen bazı çalışmalarda EGFR aşırı ekspresyonunun prognostik bir önemi olmadığı öne sürülmüştür. Diğer taraftan, *EGFR* gen kopya sayısı ile protein ekspresyonu arasında korelasyon gözlenmektedir. EGFR aşırı eksprese eden tümörlerin çok büyük kısmında EGFR geninin lokalize olduğu 7. kromozomun sayısında artış gözlenmekte olup, hastaların sadece % 10'unda gen amplifikasyonu gözlenmektedir. Ayrıca gen

kopya sayısı yada gen amplifikasyonu olmayan tümörlerde de *EGFR* geninin aşırı ekspresyonunun gözlenmesi, EGFR aşırı ekspresyonunda başka mekanizmaların da etkin olabileceğini göstermektedir (29).

Hedeflenmiş terapi tümör gelişiminde önemli rol oynadığı bilinen seçilmiş tek bir molekül üzerine spesifik olarak etki gösteren biyolojik antikanser ilaçların kullanımını ifade eden bir terimdir. NSCLC tedavisinde en yaygın olarak incelenen hedeflenmiş terapiler antianjiogenetik ajanlar ve EGFR inhibitörleridirler (42). EGFR aktivasyonu NSCLC’de tümör büyümesi ve proliferasyon, anjiyogenez, apoptoz inhibisyonu, invazyon ve metastazı indüklemektedir (43). EGFR proteininin ekstraselüler domainini hedefleyen antikolar ve tirozin kinaz fonksiyonunu engelleyen küçük moleküller (gefitinib ve erlotinib) EGFR sinyal yolağını engellemek üzere geliştirilmiş olan ajanlardır. EGFR’nin NSCLC gelişimindeki rolü nedeniyle bu sinyal yolağını inhibe etmek amacıyla geliştirilmiş olan monoklonal antikolar (mAb) EGFR’nin ekstraselüler altbirimine bağlanarak EGFR’nin kendi ligandlarının bağlanmasını kompetitif olarak engeller. EGFR-mAb kompleksi internalize edilmekte, ve bu internalizasyon EGFR’nin hücre yüzeyindeki ekspresyon ifade oranının azalmasını sağlamaktadır (26). EGFR genine yönelik olarak sentezlenmiş bir monoklonal antikor olan cetuximab doz bağımlı bir biçimde hücre döngüsünün G1 fazında bloklanması, programlı hücre döngüsünün uyarılması ve tümör anjiyogenezinin baskılanması yoluyla hücre proliferasyonunu baskılar. Ayrıca kimerik yapısından dolayı bu antikor konakçı immün sistemini uyararak antikor-bağımlı hücre aracılı sitotoksisite de oluşturabilir (44). EGFR TKI’ler ise reseptör internalizasyonunu etkilememektedir. EGFR TKI’ler EGFR in ATP cebini bloke ederek EGFR fosforilasyonunu ve dolayısı ile sinyalleşmesini baskılamaktadır (26). Erlotinib oral yolla alınan düşük moleküler ağırlıklı quinazolin temelli bir ajan olup seçici ve geri dönüşümlü olarak EGFR nin TKI aktivitesini ATP ile yarışarak inhibe etmektedir. Yarı ömrü 36 saat olan erlotinibin oral yolla alınımından sonra % 60’ı emilmektedir. Emilen erlotinib’in % 93’ü proteine bağlı olarak bulunmaktadır. Erlotinib P450 sistemi ile (özellikle CYP3A4 ile) metabolize edilmektedir. Erlotinib 2005 yılının Ekim ayında European Medicinal Evaluation Agency tarafından kemoterapi dirençli ileri evre NSCLC hastalarının tedavisi için onaylanmıştır (45).

EGFR TKI terapisi, akciğer kanseri hastalarının % 9-18’sinde klinik ya da patolojik cevaplılık sağlamaktadır. Histopatolojik olarak BAC ya da adeno/BAC tanısı alan olgular, sigara kullanım öyküsü olmayanlar, ve kadın hastalar bu terapilere daha fazla yanıt vermektedir (43). EGFR protein ekspresyonunun EGFR TKI’lere cevaplılıkla ilişkisi üzerine yapılan çalışmaların sonuçları arasındaki farklılıkların çalışılan hasta popülasyonu ve kullanılan metodların farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (46). 2004 yılında iki araştırma grubu kemoterapiye dirençli NSCLC hastalarının bir kısmının EGFR TKI’leri ile tedavi edildiklerinde tedaviye cevap verdiklerini ve tedaviye cevap veren olguların büyük bir kısmında *EGFR* geninin tirozin kinaz alt birimini kodlayan ekzonlarında mutasyon bulunduğunu göstermişlerdir. Bu güne kadar yapılan çalışmalar *EGFR* geninde mutasyon olmayan NSCLC olgularının % 10’u, *EGFR* geninde mutasyona sahip olan NSCLC hastalarının ise % 70’inin bu ilaçlara cevap verdiğini göstermektedir. Ayrıca EGFR TKI ile tedavi edildiklerinde *EGFR* mutasyonuna sahip olan hastaların bu mutasyona sahip olmayan hastalardan daha uzun sağkalım

süresine sahip olduğu bildirilmiştir. *EGFR* mutasyonlarının genellikle dişilerde, sigara kullanmayanlarda, adenokarsinoma histolojisine sahip tümörlerde ve doğu asya kökenli hastalarda gözlemlendiği bildirilmiştir. *EGFR* mutasyonlarının, sigara içmeyen bireylerde içenlerden daha yüksek sıklıkta gözlenen bir genetik değişiklik olması nedeniyle özellikle önem kazanmaktadır. Ayrıca sigara kullanan bireyler kullanım alışkanlıkları açısından değerlendirildiğinde sigara kullanım miktarı ile *EGFR* mutasyon görülme yüzdesi arasında ters bir ilişki olduğu gözlenmektedir. Bu sonuçlar *EGFR* mutasyonlarının sigara içerisinde bulunan karsinojenlerin dışında başka bir karsinojen tarafından oluşturulduğunu düşündürmektedir. *EGFR* mutasyonları genellikle genin tirozin kinaz domainini kodlayan ilk 4 ekzonunda bulunmaktadır. Yaklaşık olarak *EGFR* mutasyonlarının % 90'ı kodon 746 ile 750 arasında bulunan 5 amino asitin (ELREA) kaybına yol açan küçük delesyonlar yada kodon 858'de Leusin'in Arjinine dönüşmesine neden olan nokta mutasyonlarıdır. Mutasyonların % 3'ü kodon 719'da meydana gelip glisin amino asidinin sistein, alanin ya da serin amino asidine dönüşmesine (G719X) neden olmaktadır. Ayrıca mutasyonların % 3'ü 20. ekzonda meydana gelen ve çerçeve kaymasına neden olmayan insersiyon mutasyonlarıdır. 20. ekzonda meydana gelen mutasyonlar nadiren aynı bireyde diğer mutasyonlar ile birlikte görülebilmektedir. Bu mutasyonların dışında pek çok nadir nokta mutasyonu da gözlenebilmektedir. 19. ekzonda meydana gelen delesyonlar ve L858R mutasyonları *EGFR*'in ve diğer HER ailesi üyelerinin liganda bağımlı olmayan bir yolla sürekli bir şekilde artmış fosforilasyonuna neden olur. Yapılan klinik çalışmalar sonucunda delesyon tipi *EGFR* mutasyonuna sahip olan hastaların *EGFR* TKI cevaplılık oranlarının diğer tip mutasyonlara sahip olanlardan daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Yüksek derecede *EGFR* geni kopya sayısı artmış olguların *EGFR* TKI 'lere cevaplılık oranı %34 iken, *EGFR* geni kopya sayısı değişmemiş ya da düşük seviyede artışa sahip bireylerin cevaplılık oranı ise %10'dur. Bu yüzdeler mutasyon pozitif hastaların cevaplılık yüzdelerinin oldukça altında kalmaktadır (28). NSCLC hücre hatları ve primer tümörlerde yapılan çalışmalar *EGFR* geni mutasyonlarının *EGFR* gen amplifikasyonu ile ilişkili olduğunu ve mutant *EGFR* alelinin seçici olarak amplifiye olduğunu göstermiştir (45). FISH yöntemi ile belirlenen *EGFR* gen amplifikasyonu ve yüksek derecedeki polizomisi NSCLC hastalarının % 31-45 'inde belirlenmiş olup, *EGFR* TKI'leri ile tedaviye cevaplılık ve daha uzun sağkalım süresi ile ilişkilendirilmektedir (47).

Mitokondriden sitokrom c'nin salınımını takiben kaspaz proteinlerinin aktivasyonu hücrelerin apoptozisinde önemli bir rol oynamaktadır. Mitokondri membranında lokalize olan proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin birbirlerine oranı, hücrelerin apoptoza gidip gitmemelerini belirleyen bir faktördür. Antiapoptotik Bcl-2 ailesine ait proteinlerin NSCLC'de aşırı olarak eksprese edildiği bilinmektedir (48). Hücre içerisinde PI3K/Akt, STAT3 ve Ras/Raf/MAPK gibi farklı yolların Mcl-1 protein ekspresyonu üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (48). Parafine gömülü NSCLC doku örneklerinden alınmış kesitlerin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi antiapoptotik Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan Mcl-1'in NSCLC hastalarının %58'inde yüksek miktarlarda eksprese edildiğini göstermiştir (47). Flavopiridol yarısentetik bir Flavonoid olup ATP ile kompetitif bir yarışa girerek hücre döngüsünün kontrolünde önemli rol oynayan siklin bağımlı kinazları inhibe eden bir ajandır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre

hatları ile yapılan çalışmalar bu molekülün tümör hücrelerinde EGFR sinyal yolağının aktivasyonu sonucunda STAT3 proteini aracılığı ile eksprese edilmekte olan antiapoptotik myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) proteininin ekspresyonunu baskıladığını göstermiştir. Bu proteinin ekspresyonunun azalması mitokondrial apoptoz yolağında dengenin proapoptotik proteinler lehine dönmesine ve hücrelerin apoptotik uyarılara daha duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır (49). NSCLC hücre hatları ile yapılmış olan bir diğer çalışmada ise Mcl-1 aşırı eksprese eden NSCLC hücre hatlarının sitotoksik ajanlar ve EGFR TKI'ler ile muamele edildikten sonra hücre canlılık oranlarının Mcl-1 eksprese etmeyen hücre hatlarından oldukça yüksek olduğunu, ve ayrıca Mcl-1 ekspresyonunun antisense oligonükleotidler kullanılarak baskılanmasının bu hücre hatlarını sitotoksik ajanlarca oluşturulan apoptotik uyarılara daha duyarlı hale getirdiğini göstermiştir. Ayrıca NSCLC hücre hatlarının EGFR TKI ve *Mcl-1* antisense oligonükleotidleri ile kombine olarak muamele edilmesinin hücre canlılığının azalmasında sinerjistik olarak etki gösterdiği belirlenmiştir (48). Edwards ve arkadaşlarının hücre hatları ile yapmış oldukları çalışmada da EGFR TKI'lere ilave olarak Mcl-1 ekspresyonunda rol oynayan sinyal yollarının kombine olarak bloke edilmesinin hücrelerin apoptoza gitmesinde sinerjistik rol oynadığı gösterilmiştir (50).

NSCLC tanılı hastalarda EGFR TK domain mutasyonlarının görülme sıklıkları açısından etnik ve coğrafik farklılıklar gözlenmekte olup EGFR TK domain mutasyonlarının bölgemizdeki NSCLC gelişimindeki rolü bilinmemektedir. Ayrıca, EGFR geni tirozin kinaz domain mutasyonu veya aşırı ekspresyonuna sahip primer NSCLC tümör dokularında EGFR TKI'lere karşı geliştirilen primer ve sekonder direncin kaynağı olabileceği öne sürülen PTEN ve Mcl-1 proteinlerinin ekspresyon profilleri bilinmemektedir.

Bu çalışmada, EGFR tirozin kinaz domaini mutasyonlarının ülkemizde NSCLC hastalarında hastalığın etiolojisindeki öneminin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, NSCLC hastalarından alınan primer tümör doku örneklerinde EGFR TK tedavisine direnç ile ilişkilendirilmekte olan, PI3-K sinyal iletim yolağında rol alan PTEN proteini ile mitokondri bağımlı apoptoz mekanizmasında önemli rol oynayan Mcl-1 proteinlerinin ekspresyon profillerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

MATERYAL ve METODLAR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı Tarafından küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tanısı almış 50 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastalara ait periferik kan ve tümör dokularından elde edilen DNA kullanılarak direk dizileme yöntemi ile EGFR geninde mutasyon taraması gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, tümör ve tümöre komşu normal akciğer dokusundan elde edilen protein ekstraktları kullanılarak Western Blot yöntemi ile EGFR, PTEN ve Mcl-1 proteinlerinin ekspresyonları incelenmiştir.

3.1 Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Tüm olgulardan operasyon öncesi K3 EDTA'lı tüpe (Vacuette) 10 ml periferik venöz kan alınmıştır. DNA izolasyonu için yüksek tuz konsantrasyonu kullanılarak proteinlerin çöktürülmesi esasına dayanan yöntem uygulanmıştır.

3.1.1 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

0.5 M EDTA (pH:7.4-8): 100 ml 0.5 M EDTA solüsyonu hazırlamak için 18.6120 gr EDTA (Sigma) 100 ml steril distile su içinde çözüldü. NaOH çözeltisi kullanılarak solüsyonun pH'sı 7.4 olarak ayarlandı. Hazırlanan solüsyon +4 °Cde saklandı.

0.1 M NaCl: 100 ml 0.1 M NaCl solüsyonu hazırlamak için 23.4 gr NaCl (Sigma) 100 ml steril distile su içinde çözüldü. Hazırlanan solüsyon oda ısısında saklandı.

White Blood Lizis Tamponu (WBL): 2.5 ml 0.1 M NaCl çözeltisi, 5 ml 0.5 M EDTA çözeltisi ve 92.5 ml steril distile su karıştırıldı. Hazırlanan solüsyon otoklavda steril edildikten sonra oda ısısında saklandı.

Eritrosit Lizis Tamponu

155 mM NH₄Cl

10mM KHCO₃

1 litre eritrosit lizis tamponu hazırlamak için 8.28 gr NH₄Cl (Sigma), 1 gr KHCO₃ (Sigma) toplam hacim 1 lt olacak şekilde distile suda çözüldü. Hazırlanan solüsyon otoklavda steril edildikten sonra +4 Cde saklandı.

9.5 M Amonyum Asetat Çözeltisi: 36.613 gr amonyum asetat (Sigma) 20 ml distile suda çözüldükten sonra toplam hacim 50 ml'e tamamlandı. Otoklavda sterilize edildikten sonra oda ısısında saklandı.

%10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) çözeltisi: 10 gr SDS (Sigma) 100 ml distile suda çözüldükten sonra 0.22 µm çaplı filtreden geçirilerek steril edildi ve oda ısısında saklandı.

Proteinaz K Çözeltisi: 10 mg Proteinaz K (Sigma) 1 ml steril distile suda çözüldü. Daha sonra 50 µl'lik kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

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

3.1.2 Uygulanan İşlemler

1. K3 EDTA'lı tüp içerisindeki 10 ml venöz kan alt üst edildikten sonra 50 ml'lik santrifüj tüpüne alındı.
2. Kan üzerine 30 ml lizis tamponu eklendikten sonra vorteks kullanılarak iyice karıştırıldı.
3. Santrifüj tüpü -20 °C buzdolabında 20 dakika bekletildikten sonra +4 °C'deki soğutmalı santrifüjde 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifügasyon sonrası oluşan dökelti uzaklaştırılarak çökelti el ile vurularak kaldırıldı.
5. Çökeltinin üzerine 20 ml lizis tamponu eklendi ve vorteks kullanılarak karıştırıldı.
6. Örnek, +4 °C'deki soğutmalı santrifüjde 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi.
7. Dökelti uzaklaştırıldıktan sonra çökelti el ile vurularak kaldırıldı.
8. Çökeltinin üzerine 9.4 ml WBL tamponu, 50 µl Proteinaz K(20mg/ml) ve 500 µl % 10'luk SDS ilave edilip yavaşça alt üst edildi.
9. 50ml'lik santrifüj tüpünün kapağı parafilm ile sarıldı ve 37 °C etüvde bir gece bekletildi.
10. 16 saat sonra bu karışımın üzerine 3.7 ml amonyum asetat (9.5 M) eklendi ve beyaz köpüklü bir görünüm elde edilinceye kadar elle vurularak iyice karıştırıldı.
11. Karışım 5000 rpm de 30 dakika santrifüj edildi.
12. Santrifügasyon sonucu oluşan dökelti yeni bir 50 ml'lik santrifüj tüpüne alındı.
13. Yeni santrifüj tüpüne alınmış olan dökeltinin üzerine 2 katı kadar etanol falkon tüpün kenarından yavaşça sızdırılarak ilave edildi.
14. Falkon tüp yavaşça alt üst edilerek DNA iplikçiklerinin toplanması sağlandı.
15. Oluşan DNA iplikçikleri 1.5 ml'lik ependorf tüp içerisinde bulunan %70'lik etanol içerisinde alındı.
16. Ependorf tüpler 12000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı.
17. Santrifügasyon sonrası oluşan dökelti uzaklaştırıldı.
18. Ependorfun kapağı açık olacak şekilde 37 °C'lik etüvde 1-2 saat tutularak alkolün DNA'dan uzaklaşması sağlandı.
19. Alkol uzaklaştıktan sonra DNA'nın üzerine 200 µl steril distile su ilave edildi ve 37°C'lik etüvde 1 saat bekletildi.
20. İzole edilen DNA'lar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.2 Tümör Dokularından DNA İzolasyonu

Ameliyat sırasında olgulardan elde edilen tümör dokularından DNA izole edilmesi için yüksek konsantrasyonda tuz çözeltisi kullanılarak proteinlerin çöktürülmesi esasına dayanan yöntem uygulanmıştır.

3.2.1 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

0.5 M EDTA (pH:8.0) [Bkz Syf. 17]

%10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi [Bkz. Syf. 17]

0.1 M Tris HCl (pH 7.4): 1.211 gr tris base (Sigma) 100 ml steril distile su içerisinde çözüldü. Derişik HCl kullanılarak solüsyonun pH'sı 7.4'e ayarlandı.

Tampon A: 1000 µl 0.1 M Tris-HCl (pH:7.4) ve 40 µl 0.5 M EDTA (pH:8) 15 ml'lik santrifüj tüpü içerisinde karıştırıldı. Toplam hacim 10 ml olacak biçimde steril distile su ilave edildi.

Ayrıştırma Tamponu: Hazırlanmış olan 10 ml tampon A üzerine 840 µl proteinaz K çözeltisi ve 340 µl %10'luk SDS çözeltisi ilave edildi. Hazırlanan tampon 3'er ml'lik tüplere ayrılarak -20 °C'de saklandı.

3.2.2 DNA İzolasyonu Sırasında Uygulanan İşlemler

1. Yaklaşık olarak 0.5 cm³ tümör dokusu 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı.
2. Tümör dokusunun üzerine 4 ml ayrıştırma tamponu ilave edildi.
3. Pro 200 homojenizatör (OFERTA) kullanılarak tümör dokusu parçalandı.
4. Homojenatı içeren 15 ml'lik santrifüj tüpü daha önceden 65 °C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde 1.5-2 saat inkübe edildi.
5. Süre sonunda su banyosundan çıkartılan örneğin üzerine 1 ml doymuş NaCl çözeltisi ilave edildi ve vorteks kullanılarak karıştırıldı.
6. 5000 rpm'de 25 °C'de 30 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj işlemi sonucunda oluşan dökelti 15 ml'lik yeni bir santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 2 katı kadar izopropanol (Sigma) ilave edildi ve yavaşça alt üst edilerek DNA'nın toplanması sağlandı.
8. Pipet kullanılarak DNA 1.5 ml'lik ependorf tüpü içerisinde bulunan, 500 µl %70'lik alkol içerisine aktarıldı.
9. 13000 rpm de 25 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.
10. Santrifüj işlemi sonunda oluşan dökelti uzaklaştırıldı.
11. Ependorf kapağı açık olarak 37°C'lik etüv de 1-1.5 saat bekletilerek alkolün uzaklaşması sağlandı.
12. Alkol uzaklaştıktan sonra üzerine 100 µl steril distile su ilave edildi.
13. DNA'nın su içerisinde çözünmesi için 37 °C'lik etüvde 30 dakika bekletildi.
14. İzole edilen DNA'lar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.3 DNA Miktarının Ölçülmesi

1. İzole edilen DNA örneklerinden 5'er µl alınarak 1.5 ml'lik ependorflar içerisine alındı.
2. DNA örneklerinin üzerine 995 µl distile su ilave edildi.
3. Spektrofotometre'de (Shimadzu) örneklerin 260 ve 280 nm'de verdiği absorbans değerleri ölçüldü.
4. Örneklerdeki DNA miktarı, örneklerin 260 nm'de verdikleri absorbans

değerinin 50 ve sulandırma faktörü değeri ile çarpılması ile µg/ml cinsinden belirlendi.

3.4 PCR için kullanılan primer dizileri

EGFR 18F Primeri	5' caa atg agc tgg caa gtg ccg tgt c 3'
EGFR 18R Primeri	5' gag ttt ccc aaa cac tca gtg aaa c 3'
EGFR 18intF Primeri	5' caa gtg ccg tgt cct ggc acc caa gc 3'
EGFR 18intR Primeri	5' cca aac act cag tga aac aaa gag 3'
EGFR 19F Primeri	5' gca ata tca gcc tta ggt gcg gct c 3'
EGFR 19R Primeri	5' cat aga aag tga aca ttt agg atg tg 3'
EGFR 19intF Primeri	5' cct tag gtg cgg ctc cac agc 3'
EGFR 19intR Primeri	5' cat tta gga tgt gga gat gag c 3'
EGFR 21F Primeri	5' cta acg ttc gcc agc cat aag tcc 3'
EGFR 21R Primeri	5' gct gcg agc tca ccc aga atg tct gg 3'
EGFR 21intF Primeri	5' cag cca taa gtc ctc gac gtg g 3'
EGFR 21intR Primeri	5' cat cct ccc ctg cat gtg tta aac 3'

3.5 PCR Karışımının Hazırlanması

	<i>Stok Konsantrasyonu</i>	<i>Kullanılan Miktar</i>
Reaksiyon tamponu	10X	2.5 µl
MgCl ₂ (Fermentas)	25 mM	4 µl
dNTP karışımı (Fermentas)	10 mM	1.5 µl
Primer (İleri)	20 pmol/µl	1 µl
Primer (Geri)	20 pmol/µl	1 µl
Taq DNA polimeraz (Fermentas)	5U/µl	0.2 µl
Genomik DNA	100 ng/µl	1 µl
Steril distile su	-	13.8 µl

Toplam hacim 25 µl olacak şekilde PCR reaksiyonu kuruldu.

3.6 EGFR Geni Ekzon 18, 19 ve 21'in PCR İşlemi ile Amplifikasyonu

Amplifikasyon işlemi, 94 °C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu sonrası 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 55°C'de 1 dakika tutunma, 72 °C'de 1 dakika uzama'dan oluşan döngünün 30 kez tekrarlanması ve 72 °C'de 10 dakika son uzama olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.7 PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu

PCR sonrası, tüp içerisindeki ürün dışı PCR bileşenlerinin uzaklaştırılmasını sağlayan pürifikasyon basamağı Invisorb Spin PCRapid Kit(250) (INVITEK) kullanılarak uygulandı.

3.7.1 PCR Pürifikasyon İşlemleri

1. PCR ürününün üzerine 130 µl Buffer P eklendi.
2. Pipet ile biraz karıştırıldıktan sonra, önceden hazırlanmış filtreler içerisine yerleştirilmiş receiver tüplerine aktarıldı.
3. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
4. 10 000 rpm de 30 saniye santrifüj edildi.
5. Receiver tüpünün altı boşaltılmadan üzerine 700 µl Wash Buffer eklendi.
6. 10 000 rpm de 30 saniye santrifüj edildi.
7. Receiver tüplerin altı boşaltıldı.
8. 14 000 rpm de 3 dakika kuru santrifüj yapıldı.
9. Sonra filtreler ependorf tüplerine alındı.
10. Üzerine 30 µl elution buffer eklendi.
11. Oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi.
12. 10 000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi ve filtreler atıldı.

3.8 Dizi Analizi PCR Reaksiyonunun Kurulması

1. 4'er µl Big Dye terminator v3.1 (Applied Biosystems) tüplere dağıtıldı.
2. 30-90 ng (5µl) PCR ürünü eklendi.
3. 3.2 pmol intronik Forward yada intronik Reverse primer eklendi
4. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde deiyonize su ile tamamlandı.
5. İyice karıştırılıp spin edilerek çöktürüldü.
6. ABI Prism 9700 PCR cihazının Perkin Elmer (PE) menüsünün Big Dye Terminator programında PCR dizileme işlemi gerçekleştirildi.

1. Tüpler termal cyclus cihazına kondu ve doğru volüme ayarlandı.
2. Başlangıç denatürasyonu:
96 °C'de 1 dakika yapıldı.
3. Aşağıdaki işlemler 25 döngü halinde gerçekleştirildi:
 - 96 °C'de 10 saniye
 - 50 °C'de 5 saniye
 - 60 °C'de 4 dakika

Pürifikasyon işlemine kadar tüpler +4 °C'de bekletildi.

3.9 Sodyum Asetat ile Dizileme Sonrası Pürifikasyon

1. Dizileme reaksiyonundan sonra PCR cihazından çıkarılan örneklerin üzerine 2'şer µl 3 M sodyum asetat eklendi
2. Üzerine %95-99'lük -20 °C'de soğutulmuş etanolden 50 µl ilave edilerek hafifçe pipetle karışması sağlandı
3. Bu karışım 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınarak -20 °C'de 15 dakika tutuldu.
4. Bu işlem sonrasında 13000 rpm de 20 dakika santrifüj yapıldı.
5. Santrifüj sonrasında dökelti uzaklaştırıldıktan sonra çökeltinin üzerine +4°C'de muhafaza edilen %70'lik etanolden 250 µl eklendi ve pipet yardımıyla hafifçe karıştırıldı.
7. 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonunda dökelti uzaklaştırıldı ve örnekler 37°C'deki etüvde

kurumaya bırakıldı.

9. Kuruma işleminden sonra her örneğin üzerine 22 µl Hi-Di Formamid (Applied Biosystems) eklendi.
10. Formamid eklenmiş olan dizileme reaksiyonu ürünleri tüp (Applied Biosystems) içerisine alındı.
11. Tüpün ağzı septa (Applied Biosystems) ile kapatıldıktan sonra 95 °C'de 5 dakika denatüre edildi.
12. Buzda 2 dakika bekletildikten sonra ABI Prism dizi analizi cihazına örnekler yüklendi. Daha sonra kapiller (Applied Biosystems), POP-6 polimer (Applied Biosystems), EDTA içeren Buffer (10x) (Applied Biosystems) ile dizi analizi cihazında (ABI 310 Prism) 36 dakika yürütüldü.
13. Örnekler yürütüldükten sonra, GenBank ulaşım numarası NM_005228.3 'dan ulaşılan EGFR cDNA dizisi referans olarak alınarak diziler okundu.

```
1 ATG CGA CCC TCC GGG ACG GCC GGG GCA GCG CTC CTG GCG CTG CTG 45
1 M R P S G T A G A A L L A L L L 15
46 GCT GCG CTC TGC CCG GCG AGT CGG GCT CTG GAG GAA AAG AAA GTT 90
16 A A L C P A S R A L E E K K V 30
91 TGC CAA GGC ACG AGT AAC AAG CTC ACG CAG TTG GGC ACT TTT GAA 135
31 C Q G T S N K L T Q L G T F E 45
136 GAT CAT TTT CTC AGC CTC CAG AGG ATG TTC AAT AAC TGT GAG GTG 180
46 D H F L S L Q R M F N N C E V 60
181 GTC CTT GGG AAT TTG GAA ATT ACC TAT GTG CAG AGG AAT TAT GAT 225
61 V L G N L E I T Y V Q R N Y D 75
226 CTT TCC TTC TTA AAG ACC ATC CAG GAG GTG GCT GGT TAT GTC CTC 270
76 L S F L K T I Q E V A G Y V L 90
271 ATT GCC CTC AAC ACA GTG GAG CGA ATT CCT TTG GAA AAC CTG CAG 315
91 I A L N T V E R I P L E N L Q 105
316 ATC ATC AGA GGA AAT ATG TAC TAC GAA AAT TCC TAT GCC TTA GCA 360
106 I I R G N M Y Y E N S Y A L A 120
361 GTC TTA TCT AAC TAT GAT GCA AAT AAA ACC GGA CTG AAG GAG CTG 405
121 V L S N Y D A N K T G L K E L 135
406 CCC ATG AGA AAT TTA CAG GAA ATC CTG CAT GGC GCC GTG CGG TTC 450
136 P M R N L Q E I L H G A V R F 150
451 AGC AAC AAC CCT GCC CTG TGC AAC GTG GAG AGC ATC CAG TGG CGG 495
151 S N N P A L C N V E S I Q W R 165
496 GAC ATA GTC AGC AGT GAC TTT CTC AGC AAC ATG TCG ATG GAC TTC 540
166 D I V S S D F L S N M S M D F 180
541 CAG AAC CAC CTG GGC AGC TGC CAA AAG TGT GAT CCA AGC TGT CCC 585
181 Q N H L G S C Q K C D P S C P 195
586 AAT GGG AGC TGC TGG GGT GCA GGA GAG GAG AAC TGC CAG AAA CTG 630
196 N G S C W G A G E E N C Q K L 210
631 ACC AAA ATC ATC TGT GCC CAG CAG TGC TCC GGG CGC TGC CGT GGC 675
211 T K I I C A Q Q C S G R C R G 225
676 AAG TCC CCC AGT GAC TGC TGC CAC AAC CAG TGT GCT GCA GGC TGC 720
226 K S P S D C C H N Q C A A G C 240
721 ACA GGC CCC CGG GAG AGC GAC TGC CTG GTC TGC CGC AAA TTC CGA 765
241 T G P R E S D C L V C R K F R 255
766 GAC GAA GCC ACG TGC AAG GAC ACC TGC CCC CCA CTC ATG CTC TAC 810
256 D E A T C K D T C P P L M L Y 270
811 AAC CCC ACC ACG TAC CAG ATG GAT GTG AAC CCC GAG GGC AAA TAC 855
271 N P T T Y Q M D V N P E G K Y 285
856 AGC TTT GGT GCC ACC TGC GTG AAG AAG TGT CCC CGT AAT TAT GTG 900
286 S F G A T C V K K C P R N Y V 300
901 GTG ACA GAT CAC GGC TCG TGC GTC CGA GCC TGT GGG GCC GAC AGC 945
301 V T D H G S C V R A C G A D S 315
946 TAT GAG ATG GAG GAA GAC GGC GTC CGC AAG TGT AAG AAG TGC GAA 990
316 Y E M E E D G V R K C K K C E 330
991 GGG CCT TGC CGC AAA GTG TGT AAC GGA ATA GGT ATT GGT GAA TTT 1035
331 G P C R K V C N G I G I G E F 345
1036 AAA GAC TCA CTC TCC ATA AAT GCT ACG AAT ATT AAA CAC TTC AAA 1080
346 K D S L S I N A T N I K H F K 360
1081 AAC TGC ACC TCC ATC AGT GGC GAT CTC CAC ATC CTG CCG GTG GCA 1125
361 N C T S I S G D L H I L P V A 375
1126 TTT AGG GGT GAC TCC TTC ACA CAT ACT CCT CCT CTG GAT CCA CAG 1170
376 F R G D S F T H T P P L D P Q 390
1171 GAA CTG GAT ATT CTG AAA ACC GTA AAG GAA ATC ACA GGG TTT TTG 1215
391 E L D I L K T V K E I T G F L 405
1216 CTG ATT CAG GCT TGG CCT GAA AAC AGG ACG GAC CTC CAT GCC TTT 1260
406 L I Q A W P E N R T D L H A F 420
1261 GAG AAC CTA GAA ATC ATA CGC GGC AGG ACC AAG CAA CAT GGT CAG 1305
421 E N L E I I R G R T K Q H G Q 435
```


1306 TTT TCT CTT GCA GTC GTC AGC CTG AAC ATA ACA TCC TTG GGA TTA 1350
 436 F S L A V V S L N I T S L G L 450
 1351 CGC TCC CTC AAG GAG ATA AGT GAT GGA GAT GTG ATA ATT TCA GGA 1395
 451 R S L K E I S D G D V I I S G 465
 1396 AAC AAA AAT TTG TGC TAT GCA AAT ACA ATA AAC TGG AAA AAA CTG 1440
 466 N K N L C Y A N T I N W K K L 480
 1441 TTT GGG ACC TCC GGT CAG AAA ACC AAA ATT ATA AGC AAC AGA GGT 1485
 481 F G T S G Q K T K I I S N R G 495
 1486 GAA AAC AGC TGC AAG GCC ACA GGC CAG GTC TGC CAT GCC TTG TGC 1530
 496 E N S C K A T G Q V C H A L C 510
 1531 TCC CCC GAG GGC TGC TGG GGC CCG GAG CCC AGG GAC TGC GTC TCT 1575
 511 S P E G C W G P E P R D C V S 525
 1576 TGC CGG AAT GTC AGC CGA GGC AGG GAA TGC GTG GAC AAG TGC AAC 1620
 526 C R N V S R G R E C V D K C N 540
 1621 CTT CTG GAG GGT GAG CCA AGG GAG TTT GTG GAG AAC TCT GAG TGC 1665
 541 L L E G E P R E F V E N S E C 555
 1666 ATA CAG TGC CAC CCA GAG TGC CTG CCT CAG GCC ATG AAC ATC ACC 1710
 556 I Q C H P E C L P Q A M N I T 570
 1711 TGC ACA GGA CGG GGA CCA GAC AAC TGT ATC CAG TGT GCC CAC TAC 1755
 571 C T G R G P D N C I Q C A H Y 585
 1756 ATT GAC GGC CCC CAC TGC GTC AAG ACC TGC CCG GCA GGA GTC ATG 1800
 586 I D A G P H C V K T C P A G V M 600
 1801 GGA GAA AAC AAC ACC CTG GTC TGG AAG TAC GCA GAC GCC GGC CAT 1845
 601 G E N N T L V W K Y A D A G H 615
 1846 GTG TGC CAC CTG TGC CAT CCA AAC TGC ACC TAC GGA TGC ACT GGG 1890
 616 V C H L C H P N C T Y G C T G 630
 1891 CCA GGT CTT GAA GGC TGT CCA ACG AAT GGG CCT AAG ATC CCG TCC 1935
 631 P G L E G C P T N G P K I P S 645
 1936 ATC GCC ACT GGG ATG GTG GGG GCC CTC CTC TTG CTG CTG GTG GTG 1980
 646 I A T G M V G A L L L L V V 660
 1981 GCC CTG GGG ATC GGC CTC TTC ATG CGA AGG CGC CAC ATC GTT CGG 2025
 661 A L G I G L F M R R R H I V R 675
 2026 AAG CGC ACG CTG CGG AGG CTG CTG CAG GAG AGG GAG CTT GTG GAG 2070
 676 K R T L R R L L Q E R E L V E 690
 2071 CCT CTT ACA CCC AGT GGA GAA GCT CCC AAC CAA GCT CTC TTG AGG 2115
 691 P L T P S G E A P N Q A L L R 705
 2116 ATC TTG AAG GAA ACT GAA TTC AAA AAG ATC AAA GTG CTG GGC TCC 2160
 706 I L K E T E F K K I K V L G S 720
 2161 GGT GCG TTC GGC ACG GTG TAT AAG GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT 2205
 721 G A F G T V Y K G L W I P E G 735
 2206 GAG AAA GTT AAA ATT CCC GTC GCT ATC AAG GAA TTA AGA GAA GCA 2250
 736 E K V K I P V A I K E L R E A 750
 2251 ACA TCT CCG AAA GCC AAC AAG GAA ATC CTC GAT GAA GCC TAC GTG 2295
 751 T S P K A N K E I L D E A Y V 765
 2296 ATG GCC AGC GTG GAC AAC CCC CAC GTG TGC CGC CTG CTG GGC ATC 2340
 766 M A S V D N P H V C R L L G I 780
 2341 TGC CTC ACC TCC ACC GTG CAG CTC ATC ACG CAG CTC ATG CCC TTC 2385
 781 C L T S T V Q L I T Q L M P F 795
 2386 GGC TGC CTC CTG GAC TAT GTC CGG GAA CAC AAA GAC AAT ATT GGC 2430
 796 G C L L D Y V R E H K D N I G 810
 2431 TCC CAG TAC CTG CTC AAC TGG TGT GTG CAG ATC GCA AAG GGC ATG 2475
 811 S Q Y L L N W C V Q I A K G M 825
 2476 AAC TAC TTG GAG GAC CGT CGC TTG GTG CAC CGC GAC CTG GCA GCC 2520
 826 N Y L E D R R L V H R D L A A 840
 2521 AGG AAC GTA CTG GTG AAA ACA CCG CAG CAT GTC AAG ATC ACA GAT 2565
 841 R N V L V K T P Q H V K I T D 855
 2566 TTT GGG CTG GCC AAA CTG CTG GGT GCG GAA GAG AAA GAA TAC CAT 2610
 856 F G L A K L L G A E E K E Y H 870
 2611 GCA GAA GGA GGC AAA GTG CCT ATC AAG TGG ATG GCA TTG GAA TCA 2655
 871 A E G G K V P I K W M A L E S 885
 2656 ATT TTA CAC AGA ATC TAT ACC CAC CAG AGT GAT GTC TGG AGC TAC 2700
 886 I L H R I Y T H Q S D V W S Y 900
 2701 GGG GTG ACC GTT TGG GAG TTG ATG ACC TTT GGA TCC AAG CCA TAT 2745
 901 G V T V W E L M T F G S K P Y 915
 2746 GAC GGA ATC CCT GCC AGC GAG ATC TCC TCC ATC CTG GAG AAA GGA 2790
 916 D G I P A S E I S S I L E K G 930
 2791 GAA CGC CTC CCT CAG CCA CCC ATA TGT ACC ATC GAT GTC TAC ATG 2835
 931 E R L P Q P I C T I D V Y M 945
 2836 ATC ATG GTC AAG TGC TGG ATG ATA GAC GCA GAT AGT CGC CCA AAG 2880
 946 I M V K C W M I D A D S R P K 960
 2881 TTC CGT GAG TTG ATC ATC GAA TTC TCC AAA ATG GCC CGA GAC CCC 2925
 961 F R E L I I E F S K M A R D P 975
 2926 CAG CGC TAC CTT GTC ATT CAG GGG GAT GAA AGA ATG CAT TTG CCA 2970
 976 Q R Y L V I Q G D E R M H L P 990
 2971 AGT CCT ACA GAC TCC AAC TTC TAC CGT GCC CTG ATG GAT GAA GAA 3015
 991 S P T D S N F Y R A L M D E E 1005
 3016 GAC ATG GAC GAC GTG GTG GAT GCC GAC GAG TAC CTC ATC CCA CAG 3060
 1006 D M D D V V D A D E Y L I P Q 1020
 3061 CAG GGC TTC AGC AGC CCC TCC ACG TCA CGG ACT CCC CTC CTG 3105
 1021 Q G F F S S P S T S R T P L L 1035
 3106 AGC TCT CTG AGT GCA ACC AGC AAC AAT TCC ACC GTG GCT TGC ATT 3150
 1036 S S L S A T S N N S T V A C I 1050
 3151 GAT AGA AAT GGG CTG CAA AGC TGT CCC ATC AAG GAA GAC AGC TTC 3195
 1051 D R N G L Q S C P I K E D S F 1065

Ekzon 18

Ekzon 19

Ekzon 21

```

3196 TTG CAG CGA TAC AGC TCA GAC CCC ACA GGC GCC TTG ACT GAG GAC 3240
1066 L Q R Y S S D P T G A L T E D 1080
3241 AGC ATA GAC GAC ACC TTC CTC CCA GTG CCT GAA TAC ATA AAC CAG 3285
1081 S I D D T F L P V P E Y I N Q 1095
3286 TCC GTT CCC AAA AGG CCC GCT GGC TCT GTG CAG AAT CCT GTC TAT 3330
1096 S V P K R P A G S V Q N P V Y 1110
3331 CAC AAT CAG CCT CTG AAC CCC GCG CCC AGC AGA GAC CCA CAC TAC 3375
1111 H N Q P L N P A P S R D P H Y 1125
3376 CAG GAC CCC CAC AGC ACT GCA GTG GGC AAC CCC GAG TAT CTC AAC 3420
1126 Q D P H S T A V G N P E Y L N 1140
3421 ACT GTC CAG CCC ACC TGT GTC AAC AGC ACA TTC GAC AGC CCT GCC 3465
1141 T V Q P T C V N S T F D S P A 1155
3466 CAC TGG GCC CAG AAA GGC AGC CAC CAA ATT AGC CTG GAC AAC CCT 3510
1156 H W A Q K G S H Q I S L D N P 1170
3511 GAC TAC CAG CAG GAC TTC TTT CCC AAG GAA GCC AAG CCA AAT GGC 3555
1171 D Y Q Q D F F P K E A K P N G 1185
3556 ATC TTT AAG GGC TCC ACA GCT GAA AAT GCA GAA TAC CTA AGG GTC 3600
1186 I F K G S T A E N A E Y L R V 1200
3601 GCG CCA CAA AGC AGT GAA TTT ATT GGA GCA TGA 3633
1201 A P Q S S E F I G A *

```

Şekil 3.1. EGFR geninin cDNA nükleotid dizilimi ve amino asit kodları.

3.10 Tümör ve Kontrol Dokulardan Protein Lizatlarının Elde Edilmesi

Normal akciğer dokuları ve tümör dokularından protein lizatlarının elde edilmesi için, hücrelerin parçalanmasını sağlayan deterjanlar, protein stabilizasyonunu sağlayan tuzlar ve proteinlerin parçalanmasını engelleyen proteaz inhibitörleri içeren Triton-X tamponu kullanılmıştır.

3.10.1 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Triton-X Tamponu

Triton-X Tamponu içerisinde bulunan kimyasal maddeler ve konsantrasyonları aşağıda verilmektedir.

NaF (Sodyumflorid)(Sigma)	100 mM
Hepes (N-(2-hidroksietil)piperazin-N-(2-etan-sulfonikası))(Sigma)	50 mM
NaCl(Sodyumklorür) (Sigma)	150 mM
Gliserol (Sigma)	%10
Triton-X 100 (Sigma)	%1.2
MgCl ₂ (Magnezyumklorid)(Sigma)	1 mM
EGTA(Etilenbis(oksietilennitrilo)tetraasetikasit)(Sigma)	1 mM
PMSF(Fenilmetansülfonilflorid)(Sigma)	1mM
Sodyumortovanadat(Sigma)	1mM
Sodyum-pirofosfat (Sigma)	10mM
Leupeptin (Sigma)	10µg/ml
Aprotinin (Sigma)	10µg/ml
Pepstatin A (Sigma)	1 µg/ml

4.199 g NaF, 13,015 g Hepes, 8.766 g NaCl, 0.09521 g MgCl₂, 0.3804 g EEGTA, 0.1742 g PMSF, 0.1839 g Sodyumortovanadat, 4.461 g Sodyum-pirofosfat tartılıp 500 ml bidistile su içinde çözüldü. 10 mg/ml'lik stoktan 1 ml Leupeptin, 10 mg/ml'lik stoktan 1 ml Aprotinin, 10 mg/ml stoktan 100 µl Pepstatin A, %10'luk gliserol'den 100 ml ve 12 ml Triton-X-100 eklendikten sonra son hacim 1 litre olacak şekilde bidistile su ile tamamlandı. 50 ml'lik santrifüj tüplerine bölünerek -20 °C'de saklandı.

3.10.2 Protein Lizatlarının Elde Edilmesi Sırasında Uygulanan İşlemler

1. 0.5 cm³ doku, 2 ml'lik ependorf içerisinde bulunan 500 µl Triton-X tamponu içerisine alındı.
2. Pro 200 homojenizatör (OFERTA) kullanılarak tümör dokusu parçalandı.
3. Elde edilen homojenat 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifügasyon sonunda oluşan dökelti steril 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınarak -20 °C'de saklandı.

3.11 Standart Protein Grafiğinin Hazırlanması

3.11.1 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Stok BSA(Bovin Serum Albümin): 0.1 gr toz BSA(Sigma) tartılıp toplam hacim 10 ml olacak biçimde bidistile su içinde çözüldü.

3.11.2 Protein Dilüsyon Serisinin Absorbanslarının Ölçülmesi

1. 1 ml stok BSA alınarak üzerine 9 ml bidistile su eklenerek 1:10 oranında sulandırıldı.
2. Hazırlanan bu çözeltiden 0.5, 1, 2.5, 5,7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 27.5, 30, 32.5, 35, 37.5, 40, 42.5 ve 45 µl'lik hacimlerde 20 farklı 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı.
3. Her ependorfa 1:4 oranında sulandırılan protein assay kitinden (Biorad) 1 ml eklenip 5 dakika beklendi.
4. Bu süre sonunda spektrofotometrede (Shimadzu) hazırlanmış olan örneklerin 595 nm'de verdikleri absorbans değerleri ölçüldü.
5. X ekseninde protein miktarı (µg/µl cinsinden) ve Y ekseninde absorbans değerleri olacak şekilde milimetrik kağıt kullanılarak standart protein grafiği hazırlandı.

3.12 Dokulardan Elde Edilen Proteinlerin Miktar Tayini

1. Dokulardan elde edilmiş olan protein lizatlarından birer mikrolitre alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüplere konuldu.
2. Her ependorfa 1:4 oranında sulandırılan Biorad protein assay kitinden 1 ml eklenip 5 dakika inkübe edildi.
3. Bu süre sonunda spektrofotometrede (Shimadzu) hazırlanmış olan örneklerin 595 nm'de verdikleri absorbans değerleri ölçüldü.
4. Her bir örnek için standart protein grafiğinde örneğin verdiği absorbans değere karşılık gelen protein miktarı µg/µl olarak belirlendi.
5. Western Blot sırasında her kuyucuğa 100 mg potein yükleneceği için her bir örnekten ne kadar alınması gerektiği hesaplandı.

3.13 Western- blot

Western-blot yöntemi uygulanarak normal ve tümör dokularındaki EGFR, PTEN, TNF-alfa ve Mcl-1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri belirlendi.

3.13.1 Western-blot'da Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Ayrıştırma Jeli Tamponu (Resolving Buffer): 90.75 g Tris-Base (Sigma) tartılarak 500 ml bidistile suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı HCL kullanılarak, 8.8'e ayarlandı.

Yükleme Jeli Tamponu (Stacking Buffer): 30.25 g Tris-Base (Sigma) tartılarak 500 ml bidistile suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı, HCL kullanılarak, 6.8'e ayarlandı.

%10'luk Sodyum Dodesil-sülfat (SDS): 10 g SDS (Sigma) tartılarak 68°C'de 100 ml bidistile su içinde çözüldü. Çözeltinin pH'sı 7.2'ye ayarlandı.

%10'luk Amonyum persülfat (APS): 1 gr APS tartılarak 10 ml bidistile su içinde çözüldü. Hazırlanan solüsyon +4 °C'de saklandı.

Akrilamid-bisakrilamid (29:1): 29 gr akrilamid (Sigma) ve 1 gr bisakrilamid (Sigma) tartılarak 100 ml bidistile su içerisinde çözüldü. Hazırlanan solüsyon alüminyum folye ile sarılarak +4 °C'de saklandı.

2X Yükleme Tamponu: 1 ml Gliserol (Sigma), 3 ml %10'luk SDS, 1.25 ml 1M Tris, 20 µl Bromofenol mavisi (Boehringer Mannheim), ve 0.5 ml B-merkaptolanol (Sigma) 15 ml'lik tüp içerisinde karıştırıldı. Enjektöre çekilip 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek partiküllerden arındırıldı. 1 ml'lik alikotlara bölünerek -20°C'de saklandı.

TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamin): Hazır solüsyon (Sigma-Aldrich) olarak kullanılmıştır.

% 6'luk Ayırıcı Jel (Resolving Jel)

5.3 ml distile su

2.5 ml ayırıştırma tamponu

2 ml akrilamid-bisakrilamid

0.1 ml %10'luk SDS

0.1 ml %10'luk APS

8 µl TEMED 15 ml'lik tüp içerisinde karıştırılarak hazırlandı.

% 10'luk Ayırıcı Jel (Resolving Jel)

3.85 ml distile su

2.5 ml ayırıştırma tamponu

3.5 ml akrilamid-bisakrilamid

0.1 ml %10'luk SDS

0.1 ml %10'luk APS

10 µl TEMED 15 ml'lik tüp içerisinde karıştırılarak hazırlandı.

Yükleme Jeli (Stacking Jel)

3 ml distile su

1.25 ml yükleme jeli tamponu

0.625 ml akrilamid-bisakrilamid

50 µl %10'luk SDS

50 µl %10'luk APS

5 µl TEMED 15 ml'lik tüp içerisinde karıştırılarak hazırlandı.

3.13.2 Örneklerin Yükleme İçin Hazırlanışı

1. Protein lizatları yükleme işlemine başlamadan 30 dakika önce derin dondurucudan çıkartıldı.
2. Lizatların kar içerisinde çözülmesi sağlandı. 100 µg protein içerecek kadar örnek alınarak ependorf tüplere konuldu.
3. Toplam hacim 15 µl olacak şekilde 15 µl Triton-X tamponu ilave edilerek tüm örneklerin aynı hacimde olması sağlandı
4. Her örneğin üzerine 5 µl 2X yükleme tamponu ilave edildi.
5. Ependorfların kapakları parafilm ile kapatılarak 5 dakika kaynar suda bekletildi.
6. Süre sonunda 30 dakika 10000 rpm de santrifüj edilen örnekler kullanılarak yükleme işlemine geçildi.

3.13.3 Örneklerin Yüklenmesi ve Elektroforez

1. Camlar önce absolü etanol ile sonra bidistile su ile yıkayıp iyice kurulandı.
2. İki cam üst üste yerleştirildikten sonra yan taraflar kısıkaçlar ile sıkıştırılarak, alt kısım ise jel dökme aparatında sıkıştırılarak dikey olarak sabitlendi.
3. EGFR proteini için %6'lık, PTEN ve Mcl-1 için %10'luk ayrıştırıcı jel hazırlandı.
4. Hazırlanmış olan ayrıştırma jeli pipet kullanılarak üst kısımda 1 cm boşluk kalacak şekilde iki cam arasına döküldü.
5. Üst kısımda bırakılan boşluk % 0.1 'lik SDS çözeltisi ile dolduruldu. 30-45 dakika ayrıcı jelin donması beklendi.
6. Süre sonunda üst kısımdaki %0.1'lik SDS döküldü ve bidistile su ile birkaç kez yıkandı.
7. Yükleme jeli hazırlanıp, ayrıcı jelin üzerine döküldü ve hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek tarak yerleştirildi.
8. 30-45 dakika sonra yükleme jeli polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice çıkartıldı.
9. Jel dökme aparatından alınan camlar elektroforez tankının içine yerleştirildi.
10. Elektroforez tankı kısa camın üst seviyesine kadar 1X elektroforez tamponu ile dolduruldu.
11. Tarakların oluşturduğu kuyucuklar elektroforez tamponu ile yıkandı.
12. İlk kuyucuğa moleküler ağırlığı bilinen proteinleri içeren protein marker'ı yüklendi.
13. Yükleme işlemine hazırlanmış olan protein örnekleri diğer kuyucuklara yüklendi.
14. Örnekler yükleme jelinde 80-90 Volt'da 15-20 dakika yürütüldü. Örneklerin ayrıştırma jeline geçmesinden sonra akım 100-120 Volt'a getirilerek yükleme tamponu içerisinde bulunan Bromofenol mavisi cam plaklardan çıkana kadar yürütme işlemi gerçekleştirildi.

3.13.4 Proteinlerin Jelden Membrana Transferi (Islak Transfer)

3.13.4.1 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

1x Protein Transfer Tamponu: 3 gr Glisin, 5.8 gr Tris baz tartılıp 800 ml bidistile su içinde çözüldükten sonra toplam hacim 1 lt olacak şekilde 200 ml Metanol (Merck) ilave edildi.

3.13.4.2 Proteinlerin Transferi Sırasında Uygulanan İşlemler

1. Membrana transfer işlemine geçilmeden 10-30 dakika önce Polivinildiflorid membran (PVDF) metanol ile ıslatıldı.
2. Camlar elektroforez tankından çıkartılarak 1X protein transfer tamponuna alındı.
3. Kuyucukların bulunduğu yükleme jeli kesilip atıldı ve jel tampon içine alındı.
4. Sandviç arasına ilk önce sünger yerleştirildi ve protein transfer tamponu iyice emdirildi.
5. Sünger üzerine transfer kağıdı tamponla doyurularak yerleştirildi.
6. Transfer kağıdı üzerine jel büyüklüğünde kesilmiş ve metanolla ıslatılmış olan membran yerleştirildi.
7. Membranın üzerine transfer tamponu emdirilmiş transfer kağıdı ve onun üzerine yine tampon emdirilmiş sünger yerleştirildi.
8. Sandviç sıkıştırılarak kapatıldı ve transfer tankına yerleştirildi.
9. Transfer tankı 1X protein transfer tamponu ile dolduruldu.
10. Jelin anot membranın katot tarafında bulunmasına dikkat edildi.
11. +4 °C'deki transfer tankında 1 gece boyunca 40 Volt ve 60-70 mA'de proteinlerin membrana transferi gerçekleştirildi.

3.13.5 Membranların Blotlanması (Antikor ile İşaretlenmesi)

3.13.5.1 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

10X Phosphate Buffered Saline (PBS): 40 gr NaCl (Merck), 1 gr KCl (Merck), 7.2 gr Na₂HPO₄ (Merck) ve 1.2 gr KH₂PO₄ (Merck) tartılıp 500 ml bidistile su içinde çözülüp, 1 M HCl kullanılarak pH: 7.4'e ayarlandı.

%0.1'lik PBST: 100 ml 10X PBS üzerine 900 ml bidistile su ve 1 ml Tween-20 (polioksietilen-sorbitanmonolaurat)(Sigma) ilave edildi.

%3'lük Süt Tozu (Bloklaama Çözeltisi): 1 gr yağsız süt tozu PBST içinde çözülüp 100 ml'ye PBST ile tamamlandı.

3.13.5.2 Membranların Antikor ile İşaretlenmesi Sırasında Uygulanan İşlemler

1. Eldiven giyilerek membranlar temiz küçük kaplara alındı.
2. Membranın üstünü kaplayacak kadar bloklaama çözeltisi konuldu ve 20 dakika Heidolph marka çalkalayıcı üzerinde prehibridizasyona bırakıldı.
3. Daha sonra çözelti dökülerek final konsantrasyon 2 µgr/ml olacak şekilde bloklaama çözeltisi içinde seyreltilmiş olan PTEN/EGFR/Mcl-1 ve GAPDH primer antikor konularak 4 saat çalkalandı.
4. Süre sonunda yıkama işlemine geçildi. 15 dakika boyunca her beş dakikada bir PBST değiştirilerek membran çalkalayıcıda yıkandı.
5. Yıkama işleminden sonra bloklaama çözeltisi içinde 1/10000 oranında seyreltilen sekonder antikor Horseradishperoxydase (HRP) konuldu ve 1 saat boyunca çalkalandı.
6. Bu işlem bittikten sonra tekrar PBST ile 15 dakika yıkama işlemi yapıldı.
7. İşlem sonunda pens aracılığıyla alınan membranın kurutma kağıdı ile suyu alındı. Stereçfilm üzerine yerleştirildi. Üzerine Enhanced chemiluminescence

- (ECL) (Amersham Biosciences) dökülüp 1 dakika bekletildi.
8. Süre sonunda ECL'in fazlası kurutma kağıdı ile alındıktan sonra stretchfilm ile üzeri örtüldü, kenarı sıkıca kapatıldı.
 9. Film kasetin içine bantlandı.
 10. Karanlık odada film membran üzerine yerleştirildi ve 1-8 dakika sonra banyo edildi.

3.13.6 Tümör ve Kontrol Örneklerinde Protein Ekspresyon Miktarlarının Belirlenmesi

Banyo sonunda elde edilen filmler Hewlett peckard marka tarayıcı ile tarandı. EGFR, PTEN ve Mcl-1 ve eşit yüklemeyi kontrol amacı ile kullanılan GAPDH antikorlarının filmde oluşturduğu bantlar Scion image adlı bilgisayar programı kullanılarak ölçüldü.

BULGULAR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi tarafından küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tanısı ile opere edilen yaşları 39 ile 79 arasında değişen ve yaş ortalamaları 61.34 olan 2'si kadın, 48'i erkek 50 olgu çalışmaya dahil edilmiştir.

4.1 Tümör Materyalinin Patolojik ve Histolojik Olarak İncelenmesi

Çalışma kapsamına alınan olgulardan lobektomi yoluyla elde edilen tümör dokuları ve bölgesel lenf nodu biopsileri patolojik olarak incelenmiş, tümörlerin evrelendirmeleri TNM sistemine, derecesi ise WHO sınıflandırmasına göre yapılmıştır. Olguların tümör dokularının patolojik olarak değerlendirilmesi sonucunda, 9 tanesi adenokarsinom, 30 tanesi yassı epitel hücreli karsinom, 9 tanesi adenosquamöz karsinom, 2 tanesi ise büyük hücreli karsinom olarak belirlenmiştir. Olguların patolojik olarak incelenmesi sonucunda TNM sınıflamasına göre dağılımları şu şekildedir, T1N0M0 3 hasta, T1N1M0 2 hasta, T2N0M0 21 hasta, T2N1M0 18 hasta, T2N2M0 1 hasta, T3N0M0 3 hasta, T3N1M0 1 hasta, T4N0M0 1 hasta. Evrelerine göre ise hastaların dağılımı şu şekilde bulunmuştur; 3 olgu evre 1a, 21 olgu evre 1b, 3 olgu evre 2a, 20 olgu evre 2b, 2 olgu evre 3a, 1 olgu ise evre 3b olarak değerlendirilmiştir. Olguların yaşları, cinsiyetleri, tümörlerin histolojik sınıflandırılmaları, tümör çapları, TNM sınıflamaları, ve histolojik evreleri ve diğer klinik takip verileri tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışma kapsamında değerlendirilen olguların klinikopatolojik verileri.

Hasta Kodu	Cinsiyet	Yaş	Materyal Alış Tarihi	Tümör Tipi	Tümör Çapı	TNM	Evre	Klinik Takip
2	E	54	20.05.2005	YEHK	8 cm	T2N0M0	1b	Ex/9a
3	E	56	26.05.2005	ASK	8 cm	T2N1M0	2a	Ex/12a
4	E	51	03.08.2005	ASK	1.1 cm	T2N0M0	1b	*
5	E	58	03.08.2005	BHK	6.5 cm	T2N1M0	2b	*
7	E	48	12.08.2005	ASK	11 cm	T2N1M0	2b	34a
8	E	66	09.09.2005	YEHK	10 cm	T2N0M0	1b	Ex/18a
9	E	47	12.09.2005	YEHK	2 cm	T2N1M0	2b	33a
11	E	69	23.09.2005	YEHK	8.5 cm	T2N1M0	2b	33a
13	E	67	30.09.2005	YEHK	4 cm	T3N0M0	2b	Ex/7a
14	E	53	13.10.2005	YEHK	8 cm	T2N0M0	1b	*
15	E	79	25.10.2005	YEHK	2 cm	T2N0M0	1b	*
16	E	65	20.10.2005	YEHK	9 cm	T2N1M0	2b	32a
18	K	69	26.12.2005	YEHK	3.5 cm	T2N1M0	2b	30a
19	E	56	16.01.2006	ASK	7.5 cm	T2N0M0	1b	29a
20	E	66	23.01.2006	ADK	5.5 cm	T2N0M0	1b	29a
21	E	70	23.01.2006	ASK	2 cm	T1N1M0	2a	*
22	E	77	31.01.2006	YEHK	6 cm	T2N2M0	3a	*
24	E	50	16.02.2006	YEHK	6 cm	T2N0M0	1b	28a
25	E	67	20.03.2006	YEHK	5 cm	T2N1M0	2b	*
26	E	67	10.03.2006	ASK	5 cm	T2N0M0	1b	Ex/23a
27	E	68	21.03.2006	BHK	2 cm	T1N1M0	2a	*
28	E	71	23.03.2006	ADK	9 cm	T2N1M0	2b	27a
30	E	58	31.03.2006	ASK	6.5 cm	T2N0M0	1b	*
31	E	60	5.04.2006	ASK	5 cm	T2N0M0	1b	*
32	E	62	10.04.2006	YEHK	8.5 cm	T2N0M0	1b	*
33	E	65	14.04.2006	ASK	9.5 cm	T3N0M0	2b	*
34	E	62	17.04.2006	YEHK	2 cm	T1N0M0	1a	26a
36	E	57	21.04.2006	YEHK	7 cm	T2N0M0	1b	26a
37	E	62	02.05.2006	YEHK	8.5 cm	T2N1M0	2b	Ex/3a
38	E	51	04.05.2006	YEHK	3 cm	T2N1M0	2b	25a
40	E	45	29.05.2006	YEHK	5.5 cm	T2N0M0	1b	*
42	E	57	20.06.2006	YEHK	6 cm	T2N0M0	1b	24a
43	E	59	10.08.2006	ADK	3.2 cm	T3N1M0	3a	22a
44	E	68	10.08.2006	YEHK	3.8 cm	T2N0M0	1b	22a
46	E	71	21.09.2006	YEHK	6.5 cm	T1N0M0	1a	*
47	E	67	20.10.2006	YEHK	4 cm	T2N1M0	2b	*
49	E	54	15.11.2006	YEHK	3.5 cm	T2N1M0	2b	19a
51	E	70	15.12.2006	ADK/BAK	11 cm	T4N0M0	3b	*
52	K	63	18.12.2006	ADK	3.2 cm	T2N1M0	2b	18a
53	E	68	07.01.2007	YEHK	4.2 cm	T3N0M0	2b	Ex/6a
55	E	59	06.03.2007	YEHK	2.5 cm	T1N0M0	1a	*
56	E	55	08.03.2007	YEHK	4.5 cm	T2N1M0	2b	16a
58	E	61	13.03.2007	ADK/BAK	2.5 cm	T2N0M0	1b	16a
59	E	54	30.03.2007	ADK	5 cm	T2N0M0	1b	*
60	E	63	01.06.2007	YEHK	2.5 cm	T2N1M0	2b	*
61	E	60	12.06.2007	YEHK	3.8 cm	T2N0M0	1b	*
62	E	39	10.08.2007	ADK	4 cm	T2N0M0	1b	10a
63	E	63	13.08.2007	YEHK	3 cm	T2N1M0	2b	10a
64	E	43	13.08.2007	YEHK	8 cm	T2N0M0	1b	10a
65	E	75	17.08.2007	ADK	4 cm	T2N1M0	2b	*

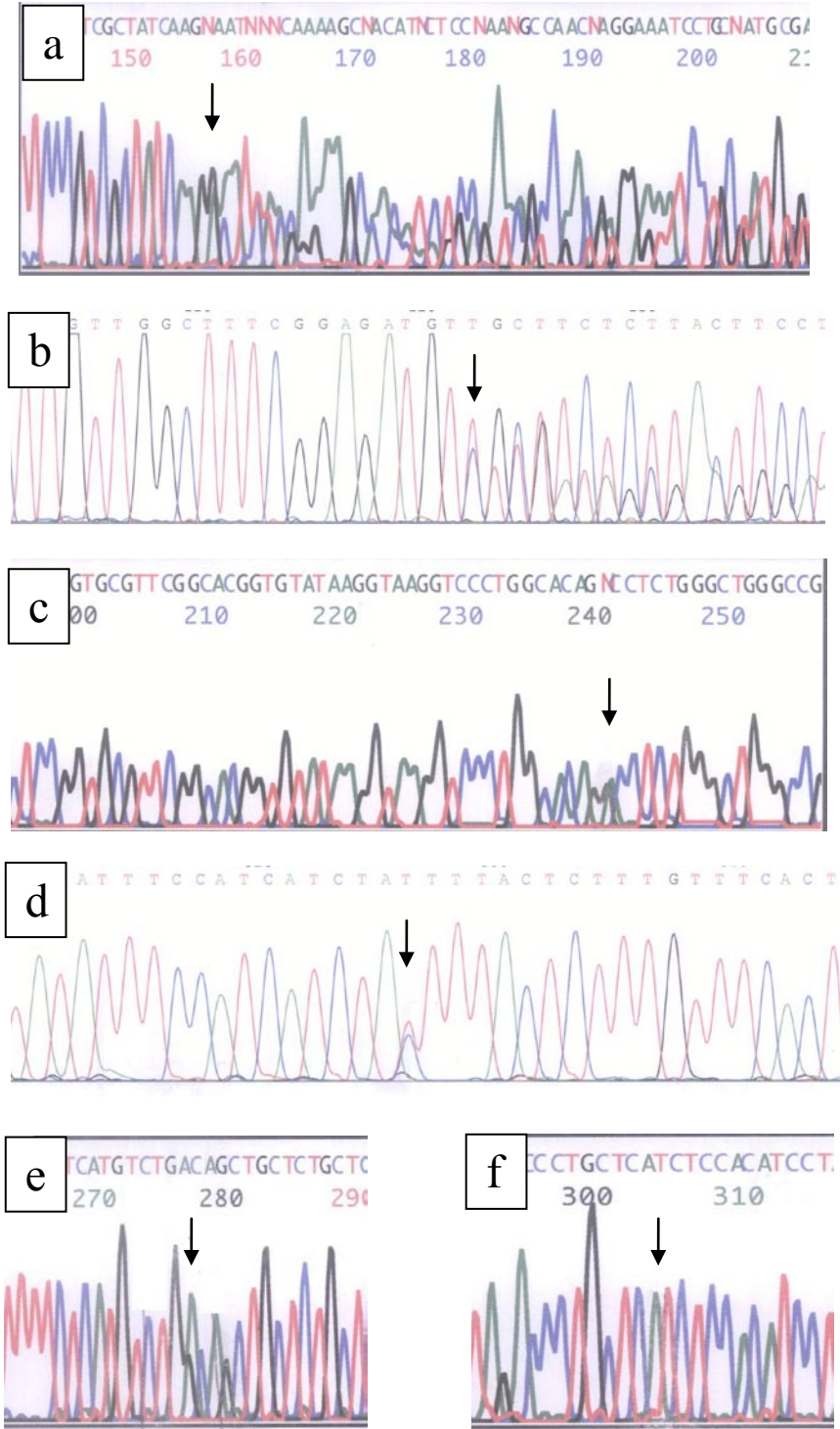
* E; Erkek, K; Kadın, TNM; Tümör Nod Metastaz, YEHK; Yassı Epitel Hücreli Karsinom, ADK; Adenokarsinom, BHK; Büyük Hücreli Karsinom, ASK; Adenosquamöz Karsinom, * Takipsiz

4.2 EGFR Geni Tirozin Kinaz Domain Mutasyon ve Polimorfizmleri

EGFR proteininin tirozin kinaz domainini kodlayan 18. ve 21. ekzonlarda çalışma kapsamına alınan 50 olgunun hiçbirinde mutasyon gözlenmezken, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tanılı 50 olgudan ikisinde (4%), 9 adenokarsinom olgusunun 2'sinde (%22.2) EGFR geninin 19. ekzonunda heterozigot durumda, cDNA'da bulunan 2235. ve 2249. nükleotidler arasında kalan 15 nükleotidin delesyonuyla ortaya çıkan ve EGFR proteininde 746 ve 750. amino asitler arasında kalan 5 amino asitin (ELREA) delesyonuna neden olan c.2235_2249 (p. Glu746_Ala750del) mutasyonu belirlenmiştir (Şekil 4.1 a-b). Bu mutasyona sahip olan olgulardan birisi (51 numaralı olgu) bronkoalveolar özellikleri belirgin adenokarsinom histolojisine sahip tümörlü bir erkek olgu iken diğeri (52 numaralı olgu) adenokarsinom histolojili tümöre sahip bir kadın olgudur. Tümör dokularında belirlenmiş olan bu mutasyonun somatik bir mutasyon olduğunu göstermek için EGFR TK domaini mutasyonu belirlenmiş olan iki olgunun periferal kanlarından izole edilen DNA örnekleri kullanılarak dizi analizi yöntemi ile incelenmiş ve ikisinde de c.2235_2249 mutasyonu gözlenmemiştir.

EGFR geninin ekzonik bölgesinde belirlenmiş olan bu mutasyona ilave olarak, EGFR geninin 18. ve 19. intronlarında 4 farklı polimorfizm belirlenmiştir. 5 olguda heterozigot durumda (%10) 18. intronda daha önce literatürde bildirilmiş olan 2184+19 G/A polimorfizmi (db SNP rs 17337 107) (Şekil 4.1 c), 8 olguda heterozigot durumda (%16) 18. intronda daha önce tanımlanmamış olan 2184+100 C/T polimorfizmi belirlenmiştir (Şekil 4.1 d). 6 olguda yine heterozigot durumda (%12) 19. intronda ise daha önce tanımlanmış olan 2283+69 G/A polimorfizmi belirlenirken (Şekil 4.1 e) 19. intronda daha önceden tanımlanmış 2283+96 A/G polimorfizmi (db SNP rs 2017000) de saptanmıştır (Şekil 4.1 f). Bu polimorfizme ait allellerin dağılımı ise şu şekildedir; AA; 22/50 (%44), AG; 17/50 (%34), GG; 11/50 (%22).

Bu polimorfizmlerin histolojik alt tiplere göre dağılımı incelendiğinde intron 18 2184+19 G/A polimorfizmi 4 yassı epitel hücreli karsinom ve 1 adenosquamöz karsinomda, intron 18 2184+100 C/T polimorfizmi 5 yassı epitel hücreli karsinom, 2 büyük hücreli karsinom ve 1 adenosquamöz karsinomda, intron 19 2283+69 G/A polimorfizmi ise 4 yassı epitel hücreli karsinom, 1 büyük hücreli karsinom ve 1 adenosquamöz karsinomda, intron 19 2283+96 A/G polimorfizminin 16 yassı epitelyum hücreli karsinom, 5 adenosquamöz karsinom, 6 adenokarsinom ve 1 büyük hücreli karsinomda gözlenmiştir. Allelik frekansları düşük olan intron 18'de yer alan 2184+100 C/T ve 19. intron'da yer alan 2283+69 polimorfizmlerinin 5'i yassı epitel hücreli karsinom ve 1'i büyük hücreli karsinomlu tümöre sahip olan 6 olguda beraber gözlenmiştir.

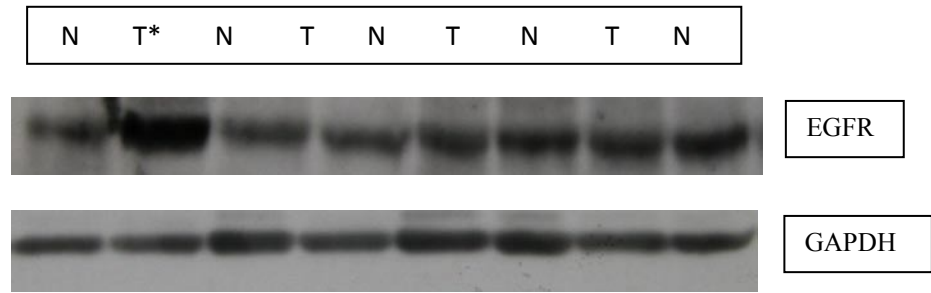


Şekil 4.1. a-b) c.2235_2249del mutasyonunun forward ve reverse primerler ile elde edilen dizi analizi görüntüsü. c) 2184+19 G/A polimorfizmi d) 2184+100 C/T polimorfizmi e) 2283+69 G/A polimorfizmi f) 2283+96 A/G polimorfizmi

4.3 Western-blot Sonuçları

4.3.1 Normal Akciğer Dokuları ve Tümör Dokularında EGFR Protein Miktarları

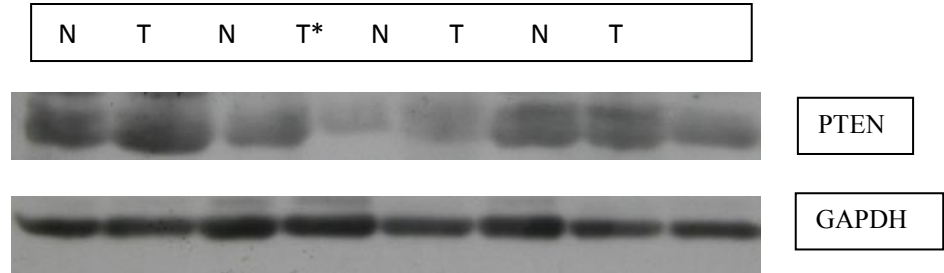
İncelenmiş olan 50 olgudan 23'ünün (% 46) tümör dokularında EGFR proteininin ekspresyonunun normal dokuya göre artmış olduğu belirlenmiştir. EGFR ekspresyon artışı gözlenen tümörlerin 14'ü yassı epitel hücreli karsinom, 4'ü adenokarsinom, 4'ü adenosquamöz karsinom, 1'i ise büyük hücreli karsinom histolojisine sahipti. EGFR ekspresyon artışının evrelere göre dağılımı incelendiğinde evre 1 olguların 12'sinde (12/24), evre 2 olguların 10'unda (10/23), evre 3 olguların ise 1'inde (1/3) EGFR ekspresyonunda artış gözlenmiştir. EGFR protein ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için yapılmış olan bir Western-blot sonucu Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.2. 27,28, 30 ve 31 numaralı olguların EGFR ve GAPDH proteinlerinin Western-blot görüntüsü N;Normal doku, T;Tümör dokusu;* EGFR proteininde ekspresyon artışı gözlenen örnek.

4.3.2 Normal Akciğer Dokuları ve Tümör Dokularında PTEN Protein Miktarları

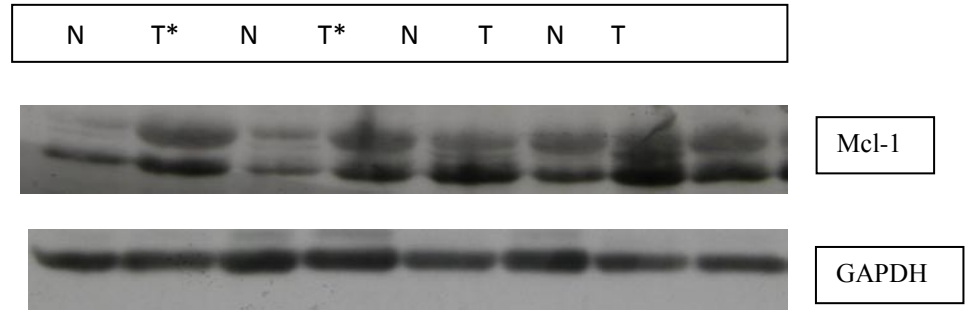
İncelenmiş olan 50 olgudan 17'sinin (% 34) tümör dokularında PTEN proteininin ekspresyonunun normal dokuya göre azaldığı belirlenmiştir. Normal akciğer dokusuna göre PTEN protein miktarında azalma gözlenen tümörlerin 13'ü yassı hücreli karsinom, 2'si adenokarsinom, 1'i adenosquamöz, 1'i ise büyük hücreli karsinom histolojisine sahipti. PTEN ekspresyon azalmasının evrelere göre dağılımı incelendiğinde evre 1 olguların 7'sinde (7/24), evre 2 olguların 8'inde (8/23), evre 3 olguların ise 2'inde (2/3) PTEN protein seviyesinin normal akciğer dokusuna göre azaldığı gözlenmiştir. PTEN protein ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için yapılmış olan bir Western-blot sonucu Şekil 4.3'de görülmektedir.



Şekil 4.3. 15,16,18, ve 19 numaralı olguların PTEN ve GAPDH proteinlerinin Western-blot görüntüsü. N; Normal doku, T;Tümör dokusu,* PTEN proteininde ekspresyon azalışı gözlenen örnek.

4.3.3 Normal Akciğer Dokuları ve Tümör Dokularında Mcl-1 Protein Miktarları

İncelenmiş olan 50 olgudan 15'inin (% 30) tümör dokularında Mcl-1 proteininin hem uzun hem de kısa izoformunun ekspresyonunun normal dokuya göre arttığı belirlenmiştir. Normal akciğer dokusuna göre Mcl-1 protein miktarında artış gözlenen tümörlerin 11'i yassı epitel hücreli karsinom, 2'si adenosquamöz karsinom, 1'i adenokarsinom, 1'i ise büyük hücreli karsinom histolojisine sahipti. Mcl-1 ekspresyon artışının evrelere göre dağılımı incelendiğinde evre 1 olguların 6'sında (6/24), evre 2 olguların ise 9'unda (9/23) Mcl-1 protein seviyesinin normal akciğer dokusuna göre arttığı gözlenmiştir. Mcl-1 protein ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için yapılmış olan bir Western-blot sonucu Şekil 4.4'de görülmektedir.



Şekil 4.4. 15,16,18 ve 19 numaralı olguların Mcl-1 ve GAPDH proteinlerinin Western-blot görüntüsü. N; Normal doku, T; Tümör dokusu; * Mcl-1 proteininde ekspresyon artışı gözlenen örnek.

PTEN ve Mcl-1 protein ekspresyon düzeyleri, EGFR proteini ekspresyon düzeyi ile birlikte değerlendirildiğinde EGFR proteininin ekspresyonunda artış gözlenen 23 olgunun 6'sında (%26) PTEN protein ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Ayrıca bu 23 olgunun 6'sında ise (%26) Mcl-1 protein ekspresyonunda artış gözlenmiştir. 44 numaralı olguda EGFR ve Mcl-1 proteinlerinin ekspresyonunda artışa eşlik eden PTEN ekspresyonunda azalma belirlenmiştir. EGFR mutasyonu bulunmuş olan iki olgudan birinde PTEN protein ekspresyonunda azalma gözlenirken diğerinde ise Mcl-1 ekspresyonunda artış gözlenmiştir.

4.4 Klinik Takip

Çalışma kapsamında değerlendirilmiş olan olgulardan 29 tanesi klinik olarak takip edilebilmiştir. Olguların takip süreleri 10 ayla 34 ay arasında değişmektedir. Klinik olarak takip edilen olguların 7'si hastalığın hızlı progresyonu sebebi nedeniyle tüm tıbbi tedavilere yanıtız hale gelmiştir.

Tablo 4.2. Çalışma kapsamında değerlendirilen olgulara ait EGFR mutasyon ve polimorfizm dağılımları ve EGFR, PTEN ve Mcl-1 protein ekspresyon seviyeleri

Hasta Kodu	Mutasyon	İntron 18 2184+19 G/A Polimorfizmi	İntron 18 2184+100 C/T Polimorfizmi	İntron19 2283+69 G/A Polimorfizmi	İntron19 2283+96 A/G Polimorfizmi	EGFR Protein Seviyeleri	PTEN Protein Seviyeleri	Mcl-1 Protein Seviyeleri
2	-	G/A	C/C	G/G	A/G	Normal	Normal	Normal
3	-	G/G	C/C	G/G	A/G	Artmış	Normal	Normal
4	-	G/G	C/C	G/G	A/G	Normal	Normal	Artmış
5	-	G/G	C/T	G/A	A/A	Artmış	Azalma	Normal
7	-	G/G	C/C	G/G	A/G	Artmış	Normal	Artmış
8	-	G/G	C/C	G/G	A/G	Normal	Azalma	Normal
9	-	G/G	C/C	G/G	A/A	Artmış	Normal	Artmış
11	-	G/G	C/C	G/G	G/G	Artmış	Azalma	Normal
13	-	G/G	C/T	G/G	A/A	Normal	Azalma	Artmış
14	-	G/G	C/C	G/G	A/A	Normal	Normal	Artmış
15	-	G/A	C/C	G/G	A/G	Artmış	Normal	Artmış
16	-	G/G	C/C	G/G	G/G	Normal	Azalma	Artmış
18	-	G/G	C/C	G/G	A/G	Normal	Normal	Normal
19	-	G/A	C/C	G/G	A/G	Artmış	Normal	Normal
20	-	G/G	C/C	G/G	G/G	Normal	Normal	Normal
21	-	G/G	C/C	G/G	A/A	Artmış	Normal	Normal
22	-	G/G	C/C	G/G	G/G	Artmış	Normal	Normal
24	-	G/G	C/C	G/G	A/A	Normal	Normal	Normal
25	-	G/G	C/T	G/A	A/A	Normal	Azalma	Normal
26	-	G/G	C/T	G/A	A/G	Artmış	Azalma	Normal
27	-	G/G	C/T	G/G	G/G	Artmış	Normal	Artmış
28	-	G/G	C/C	G/G	G/G	Normal	Normal	Normal
30	-	G/G	C/C	G/G	A/A	Normal	Normal	Normal
31	-	G/G	C/C	G/G	A/A	Normal	Normal	Normal
32	-	G/G	C/C	G/G	A/A	Normal	Azalma	Normal
33	-	G/G	C/C	G/G	A/A	Normal	Normal	Normal

34	-	G/G	C/T	G/A	A/A	Artmış	Azalma	Normal
36	-	G/G	C/T	G/A	G/G	Normal	Normal	Artmış
37	-	G/G	C/C	G/G	A/A	Normal	Azalma	Artmış
38	-	G/G	C/C	G/G	A/G	Artmış	Normal	Normal
40	-	G/G	C/C	G/G	A/G	Artmış	Azalma	Normal
42	-	G/G	C/C	G/G	A/A	Normal	Normal	Normal
43	-	G/G	C/C	G/G	A/G	Normal	Azalma	Normal
44	-	G/G	C/T	G/A	A/A	Artmış	Azalma	Artmış
46	-	G/G	C/C	G/G	A/G	Normal	Azalma	Artmış
47	-	G/G	C/C	G/G	A/A	Artmış	Azalma	Normal
49	-	G/G	C/C	G/G	G/G	Normal	Normal	Normal
51	c.2235 2249del	G/G	C/C	G/G	A/A	Normal	Azalma	Normal
52	c.2235 2249del	G/G	C/C	G/G	A/A	Normal	Normal	Artmış
53	-	G/A	C/C	G/G	A/A	Normal	Normal	Artmış
55	-	G/A	C/C	G/G	A/G	Artmış	Normal	Artmış
56	-	G/G	C/C	G/G	A/A	Normal	Normal	Normal
58	-	G/G	C/C	G/G	A/G	Artmış	Normal	Normal
59	-	G/G	C/C	G/G	G/G	Artmış	Normal	Normal
60	-	G/G	C/C	G/G	A/G	Normal	Azalma	Normal
61	-	G/G	C/C	G/G	G/G	Artmış	Normal	Normal
62	-	G/G	C/C	G/G	G/G	Artmış	Normal	Normal
63	-	G/G	C/C	G/G	A/A	Normal	Normal	Normal
64	-	G/G	C/C	G/G	A/G	Artmış	Normal	Normal
65	-	G/G	C/C	G/G	A/A	Artmış	Normal	Normal

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri genellikle geç dönemde tanı konması ve kullanılan kemoterapötik ilaçlara karşı dirençli olmaları nedeniyle kötü prognoza sahip bir kanser türüdür. Günümüzde NSCLC tedavisinde cerrahi operasyon, kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri uygulanmaktadır. Platinum temelli kombine terapi uygulanan NSCLC hastaların %20'sinde cevaplılık gözlenmekte olup hastaların ortalama yaşam süreleri 8-12 ay arasında değişmektedir. Son yıllarda ise NSCLC primer tümör dokularında ve hücre hatlarında ekspresyonu değişmiş, hücre çoğalması ve apoptoz mekanizmasında rol oynayan spesifik proteinlerin inhibisyonuna yönelik özgül küçük moleküllerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. EGFR tirozin kinaz inhibitörleri NSCLC 'de hedeflenmiş tedavi için en umut verici ajanlardır.

2000-2003 yılları arasında Massachusetts hastanesinde 275 ileri evre kemoterapiye dirençli küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastaya tek ajan olarak Gefitinib verilmiştir. Bu hastalardan 25'inin Gefitinib terapisine olumlu yanıt verdiği gözlenmiştir. Bu hastaların 9'unun primer tümör dokusunda EGFR geninin 28 ekzonu dizi analizi yöntemi ile incelenmiş ve olguların 7'sinde genin tirozin kinaz bölgesini kodlayan ekzonlarda heterozigot mutasyonlar belirlenmiştir. Bu olguların normal akciğer dokularında ise mutasyon belirlenmemiş olması EGFR TK mutasyonlarının tümör oluşumundan sonra ortaya çıktığını düşündürmüştür. Bu bulgular EGFR geni TK domaininde mutasyon taşıyan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tanılı hastaların EGFR TKI'ler ile tedavi edilebileceğini düşündürmüştür (51). Aynı dönemde Paez ve arkadaşları 119 primer NSCLC'li olgunun 16'sının tümör dokularında EGFR geninde mutasyon belirlemişlerdir. EGFR geni mutasyonlarının uzakdoğu orijinli bireylerde, kadınlarda ve adenokarsinom tanılı olgularda diğer gruplardan daha yüksek sıklıkta görüldüğünü bildirmişlerdir (52). Pao ve arkadaşları primer NSCLC'de EGFR mutasyonu sıklığını % 5 olarak bildirmişlerdir (53). Bu çalışmalarda, uzakdoğu orijinli hastalarda EGFR geni mutasyonlarının görülme oranının daha yüksek olduğunun belirlenmesi üzerine uzak doğulu NSCLC hastalarında EGFR mutasyonlarının taranmasına yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları tablo 5.1'de görülmektedir. Tabloya bakıldığında NSCLC tanılı hastalarda EGFR geninin TK domaininde mutasyon görülme sıklığı uzak doğulu toplumlarda oldukça yüksek olup, % 17 ile % 42 arasında değişmektedir. Bu mutasyonların görülme sıklığına ilişkin çok çalışma bulunmamasına rağmen Kafkas orijinli NSCLC hastalarında bu oran % 5 ile 13 arasında değişmektedir. Al-Kuraya ve arkadaşlarının yaptığı tek çalışmada ise Suudi kökenli NSCLC hastalarda bu mutasyonların görülme sıklığı % 2.9 olarak belirlenmiştir (52-65). Bizim çalışmamızda incelenmiş olan 50 olgudan ikisinde (% 4) EGFR geninde mutasyon belirlenmiştir. Belirlenen bu oran diğer kafkas ve arap orijinli NSCLC'lu hastalarda yapılmış olan çalışmalarda belirlenmiş olan oranlara benzerlik göstermektedir (Tablo 5.1).

NSCLC tanılı olgularda gözlenen mutasyonların dağılımı incelendiğinde 19. ekzonda çerçeve kaymasına neden olmayan delesyon tipi mutasyonlar ve 21. ekzonda gerçekleşen L858R amino asit değişimine neden olan mutasyonların olguların %90'ından fazlasında bulunduğu gözlenmiştir (63,66). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak iki olgumuzun (51 ve 52 numaralı olgular) 19. ekzonunda heterozigot durumda gözlenen ve çerçeve kaymasına neden olmayan p. Glu746_Ala750del delesyon tipi mutasyon belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda EGFR mutasyonları ile tümörlerin histolojik tipi değerlendirildiğinde EGFR mutasyonlarının tüm histolojik tiplerde görülebileceği ancak adenokarsinom'larda görülme sıklığının (% 40-47) diğer histolojik alt tiplerde görülme sıklığından (% 3-9.2) çok daha yüksek olduğu gözlenmiştir (55,59,64). Bizim çalışmamızda 9 adenokarsinom histolojisine sahip NSCLC'lu olgudan 2'sinde (% 22.2) EGFR geni mutasyonu belirlenmiştir. Yassı epitel hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom ve diğer tip NSCLC tümör dokularının hiç birisinde EGFR geni mutasyonu belirlenmemiştir. Çalışmamızda adenokarsinom histolojisine sahip tümörlerde EGFR geni mutasyonlarının sıklığının, daha önce yayınlanmış olan değerlerden daha düşük olmasının, hasta sayısının yetersizliğinden kaynaklanılabileceğini düşünmekteyiz.

Adenokarsinomlar tümör hücrelerinin çoğalma tipine göre bronkoalveolar ve karsinom özelliği taşıyan adenokarsinom ve bronkoalveolar ve karsinom özelliği taşımayan adenokarsinom olmak üzere iki alt grupta incelenmektedirler. EGFR mutasyonları ile adenokarsinom alt tipleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde BAC özellikleri taşıyan adenokarsinom'larda EGFR geni mutasyonu sıklığının BAC özellikleri taşımayan adenokarsinomlardan daha yüksek olduğu bildirilmektedir (67). Bizim çalışmamızda BAC özellikleri taşıyan adenokarsinomlu 2 olgunun 1'inde (% 50), BAC özellikleri taşımayan adenokarsinomlu 7 olgunun 1'inde (% 14) EGFR geninde mutasyonu belirlenmiştir. Bu bulgu daha önce yapılmış olan çalışmalarla uyum göstermektedir.

EGFR mutasyonları ile ilişkilendirilmiş olan bir diğer klinikopatolojik faktör de hastanın cinsiyetidir. Yapılan çalışmalar NSCLC'lu kadın olgularda EGFR geni mutasyon sıklığının (% 42.9-50), NSCLC'lu erkek olgulardan (% 4-23.1) daha yüksek olduğunu göstermiştir (55,59,64). Bizim çalışmamızda da 48 erkek NSCLC olgusunun 1'inde 2 kadın NSCLC olgusunun 1'inde mutasyon belirlenmesi literatürdeki bulgular ile uyum göstermektedir.

Bu bulgular bronkoalveolar özelliklere sahip adenokarsinomlu hastaların ve kadın NSCLC 'li hastaların EGFR geni mutasyonuna sahip olma olasılığı en yüksek grup olduğunu ve bu özelliklere sahip kemoterapiye dirençli NSCLC'li hastalarda EGFR geninde TK domain mutasyon taraması yapılarak hastaların EGFR proteinini hedefleyen tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi edilebileceğini desteklemektedir.

Daha önce NSCLC tümör dokularında Western-blot, immünohistokimya ve kantitatif real time PCR gibi farklı yöntemler kullanılarak yapılmış olan çalışmalar olguların % 27-83'ünde EGFR proteininin aşırı eksprese edildiğini göstermiştir (68-70). Çalışmamızda, cerrahi operasyon yoluyla elde edilen tümör ve normal akciğer

dokularında, NSCLC'lerinde aşırı ekspresyonu gözleendiği bilinen EGFR proteininin ekspresyon seviyesi western-blot tekniği ile incelenmiştir. Çalışmamız kapsamında incelenmiş olan 50 olgunun 20'sinde (% 40) EGFR proteini ekspresyonunun normal akciğer dokusuna göre artmış olduğu belirlenmiş olup bu değer daha önce yapılmış olan çalışmalarla uygunluk göstermektedir. Yine daha önceki çalışmalar ile uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da, EGFR proteini aşırı ekspresyonunun görülme sıklığı yassı epitel hücreli karsinomda diğer histolojik alttiplerde görülme sıklığından daha yüksek bulunmuştur (70-72). Tümör evrelerine göre EGFR ekspresyon artışları değerlendirildiğinde, tümör evresi ile EGFR ekspresyon artışı arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Bu bulgu Daha önce yayınlanmış olan çalışmalarla uyumludur (73, 74). EGFR proteininin aşırı ekspresyonunun NSCLC'li hastalarda prognostik olarak önemine dair birbiriyle çelişen yayınlar bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar EGFR aşırı ekspresyonunun prognostik olarak önemli olmadığını öne sürerken diğer araştırmacılar EGFR aşırı ekspresyonunun sağkalım süresinin kısalması ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu öne sürmektedir. EGFR ekspresyon seviyesinin NSCLC hastalarının sağkalımları üzerine etkisini inceleyen 18 çalışmada yer alan 2972 hastanın değerlendirildiği bir meta analiz çalışmasında EGFR aşırı ekspresyonunun hastaların sağkalımı üzerine etkili olmadığı gözlenmiştir. Klinik olarak takip edilebilmiş olan 29 olgumuzun EGFR protein seviyeleri ve sağkalım süreleri değerlendirildiğinde, EGFR ekspresyonunda artış gözlediğimiz 13 olgunun 2'si (%16), EGFR ekspresyonunda artış gözlemediğimiz olguların ise 5'i (% 31) hastalığın hızlı progresyonu sebebi nedeniyle tüm tıbbi tedavilere yanıtız hale gelmiştir. Her ne kadar bu veriler EGFR ekspresyon artışının hastaların klinik tablosu üzerinde negatif bir etkiye sahip olmadığını düşündürse de, 21 hastaya ait klinik takibin yapılamamış olması ve tüm olguların takip sürelerinin farklı olması nedeniyle EGFR protein ekspresyonunun klinik açıdan öneminin uzun süreli takiplerin tamamlanmasından sonra yapılmasının daha doğru olacağını düşünmekteyiz. Çalışmalar arasında, EGFR aşırı ekspresyon sıklıkları ve prognostik önemi açısından gözlenen farklılıkların EGFR ekspresyonunun incelenmesinde farklı antikörlerin kullanılması, farklı protokollerin uygulanması, aşırı ekspresyon tanımlama kriterlerinin farklılık göstermesi ve hasta popülasyonlarının farklı özelliklere sahip olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (75).

IDEAL ve INTACT 1/2 faz II çalışmalarında EGFR ekspresyon seviyesi ile EGFR TKI'lerine cevaplılık arasında ilişki bulunamamıştır. Ancak, EGFR TKI'lerine cevaplılık ve EGFR ekspresyon seviyesi arasındaki ilişkiyi değerlendiren BR.21 faz çalışmasında EGFR proteinini aşırı eksprese eden NSCLC'li hastaların EGFR eksprese etmeyen olgulara göre EGFR tirozin kinaz inhibitörleri ile tedaviden daha fazla yarar gördüklerini ve bu hastaların sağkalım sürelerinin arttığını göstermiştir (76). Capuzzo ve arkadaşları da EGFR aşırı ekspresyonu gösteren olguları ekspresyon düzeyi değişmeyen olgularla karşılaştırdıklarında, EGFR TKI'ler ile tedaviye duyarlılık oranlarının daha yüksek (% 21-% 5), hastalığın ilerlemesi oranlarının daha düşük, dolayısıyla yaşam sürelerinin de daha uzun olduğunu göstermişlerdir (77). Bu bulgular kullanılan antikörler ve EGFR ekspresyon seviyesi değerlendirilirken kullanılan kriterlerin standardizasyonu sağlanabilirse NSCLC'li olgularda EGFR protein ekspresyon seviyesinin belirlenmesinin de EGFR TKI'lerine cevaplılığı öngören bir markır olarak kullanılabileceğini göstermektedir. FDA, EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinin kemoterapiye dirençli ileri evre NSCLC

hastalarının tedavisinde kullanılabilmesi için onay vermiştir. Çalışma kapsamında değerlendirdiğimiz olgular primer opere edilebilir küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastaları olduğu için EGFR tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi almamış olgulardır. Bu nedenle, tümör dokusunda artmış EGFR proteini ekspresyon seviyesinin EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine cevaplılık için bir belirteç olup olmadığına dair bir değerlendirme yapılamamıştır.

Aktive edici EGFR tirozin kinaz mutasyonlarına sahip hastalarda EGFR TKI'ler ile elde edilen cevaplılığa rağmen 6-12 ay sonra bu ilaçlara karşı direnç gelişebilmektedir. EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinin etkinliğinin artırılabilmesi ve EGFR TKI'lere karşı oluşan direnci ortadan kaldırılabilmesi için EGFR TKI'leri ile kombine olarak kullanılacak yeni ilaçların geliştirilmesinin gerekliliği ortaya çıkmıştır. EGFR TKI'lerin biyolojik etkinliğini belirleyen ve ilaca direnç geliştirilmesine neden olan mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik çalışmalar ise devam etmektedir. Adenokarsinom hücre hatlarında yapılan bir çalışmada PTEN ekspresyonunda azalma gözlenen ve EGFR TKI'lere karşı dirençli alt hücre popülasyonlarının varlığı gösterilmiştir. Bu bulgular PTEN ekspresyon kaybının EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinin biyolojik etkinliğini belirleyen bir faktör olduğunu düşündürmüştür (78). Kemoterapiye dirençli olan ve EGFR TKI tedavisi uygulanmış olan EGFR geni tirozin kinaz domaini mutasyonuna sahip NSCLC olgularda yapılmış olan bir çalışmada da tümör dokularında PTEN kaybı gözlenen olguların sağkalım sürelerinin PTEN eksprese eden tümörlere sahip olan olgulardan daha uzun olduğu gösterilmiştir (79). Çalışmamızda küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastaların % 34'ünün tümör dokusu örneklerinde PTEN proteini ekspresyonunun, normal dokuya göre azaldığı belirlenmiştir. PTEN ekspresyon kaybının evrelere göre dağılımı değerlendirildiğinde evre 1 ve evre 2 arasında fark gözlenmezken, evre 3 küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde PTEN ekspresyon kaybının diğer evrelere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. PTEN protein ekspresyonu azalmasını ileri evre NSCLC ile ilişkilendiren yayınlar bulunmasına rağmen bu ilişkiyi reddeden yayınlar da mevcuttur (80,81). Bu bulgular PTEN ekspresyonunun evreler ile ilişkisinin tam olarak ortaya konması için daha fazla sayıda çalışma yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca çalışmamızda, EGFR ekspresyon artışı gözlenmiş olan 21 olgunun 7'sinde ve EGFR geninde mutasyon gözlenmiş 2 olguda PTEN ekspresyonunda azalma gözlenmiş olması PTEN ekspresyon kaybının EGFR TKI'lere karşı gözlenen primer direncin nedenlerinden biri olabileceği görüşünü desteklemektedir. Bu nedenle EGFR TKI'leri ile kombine olarak kullanılacak PI3-K/Akt yolağının alt basamaklarını bloke edici ajanların geliştirilmesi EGFR TKI'lerin etkinliğinin artırılmasına neden olabilir.

EGFR TKI'lerinin etkinliğinin artırılmasında, mitokondri membran geçirgenliğini kontrol eden antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ekspresyon seviyelerinin azaltılmasını veya bu proteinlerin apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini baskılamasını engelleyen ajanlar en umut vaad edici yaklaşımlar olarak ön plana çıkmaktadır. Mitokondriyal apoptoz mekanizmasında rol oynayan ve NSCLC tümör dokularında aşırı eksprese edildiği bilinen Mcl-1 proteini bu yaklaşımlardaki temel noktayı oluşturmaktadır.

Mcl-1, ilk kez 1993 yılında insan myeloid hücre hatlarının farklılaşması sırasında eksprese edildiği belirlenmiş olan bir proteindir. 1995 yılında immünohistokimyasal olarak farklı insan dokularının incelenmesi sonucunda akciğer dokusu da dahil pek çok dokuda farklı seviyelerde eksprese edildiği gözlenmiştir (82). 1999 yılında NSCLC primer tümör dokularının immünohistokimya yöntemi ile incelenmesi sonucunda bu dokuların % 58'inde Mcl-1 proteininin aşırı eksprese edildiği belirlenmiştir. Ancak bu çalışmada Mcl-1 proteini aşırı ekspresyonu ile hastaların klinik ve patolojik verileri arasında herhangi bir ilişkisi belirlenmemiştir (37). Mcl-1 proteininin alternatif splicing ile oluşan kısa izoformu 2000 yılında tanımlanmış olup bu izoformun, orijinal protein ürününden farklı olarak proapoptotik etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür (83).

NSCLC hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda hemen hemen tüm NSCLC hücre hatlarının farklı seviyelerde Mcl-1 proteinini eksprese ettiği belirlenmiştir. CMV promotörü ile eksprese edilen Mcl-1 ekspresyon vektörü ile transfecte edilmiş NSCLC hücre hatlarının kemoteröpatik ajanlar ve EGFR TKI'leri ile oluşturulan apoptotik uyarılara karşı dirençli hale geldiği gözlenmiştir. NSCLC hücre hatlarının Mcl-1 mRNA'sına spesifik olarak sentezlenmiş olan antisens oligonükleotidler ile transfectasyonu diğer Bcl-2 ailesi üyesi proteinlerin ekspresyonunu etkilemeksizin Mcl-1 protein ekspresyonunu baskıladığı ve bu hücrelerde kaspaz aktivitesinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Mcl-1 antisens oligonükleotidleri ile transfecte edilmiş NSCLC hücre hatlarının NSCLC tedavisinde kullanılan kemoteröpatik ajanlar tarafından oluşturulan apoptotik uyarılara karşı daha duyarlı hale geldiği gözlenmiştir (48).

Bcl-2 ailesi inhibitörü olarak geliştirilen küçük moleküllerden birisi de GX15-070 olup, antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerine bağlanarak bu proteinlerin proapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerine bağlanmalarını engellemektedir. Bu etki sonucunda apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri aktive olarak sitokrom c'nin salınımını sağlayarak apoptozu indüklemektedirler. EGFR tirozin kinaz domaini mutasyonuna sahip NSCLC hücre hatlarının EGFR TKI'leri ve GX15-070 ile birlikte muamele edilmesi hücrel apoptoz oranını arttırmaktadır (84). NSCLC'da sıklıkla aktive olduğu bilinen STAT proteinlerini hedefleyen G-quartet oligonükleotidler de NSCLC tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmeye çalışılan bir diğer yaklaşımdır. NSCLC tümörü bulunan nude mice'da G-quartet oligonükleotidlerin uygulanması sonucunda selektif olarak STAT3 aktivitesinin inhibe edildiği ve bunun sonucunda STAT3 aracılığı ile eksprese edilen Mcl-1'i de içeren genlerin ekspresyonunun baskılandığı ve böylece apoptozun arttığı gösterilmiştir (85). Yapılan bir diğer çalışmada da NSCLC hücre hatlarının STAT3 spesifik çift zincirli oligodeoksinükleotidler ile muamele edilmesinin hücrelerde spesifik olarak Mcl-1 protein ekspresyonunu baskıladığı ve apoptozu uyardığı belirlenmiştir (31). Çalışmamızda NSCLC tanılı hastaların primer tümör dokularının % 30'unda Mcl-1 ekspresyon artışı gözlenmiştir. Evrelere göre Mcl-1 ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde evre 2 NSCLC 'de Mcl-1 ekspresyonunda artış görülme sıklığının evre 1 olgulardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yapılan literatür taramasında Mcl-1 proteininin evreler ile ilişkisini gösteren herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Çalışmamız kapsamında ancak sınırlı sayıda olgu değerlendirilebildiği için Mcl-1 proteininin, hastalığın progresyonu ile ilişkisinin

belirlenebilmesi amacıyla daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Çalışmamızda EGFR ekspresyonunda artış gözlenen 21 olgunun 6'sında, aynı zamanda Mcl-1 ekspresyonunda azalma da belirlenmiştir. Bu bulgu, sınırlı sayıda örnekte elde edilmiş olsada, EGFR protein ekspresyonu artmış olan olgularda Mcl-1 proteininin de ekspresyonundaki artışın EGFR TKI'leri ile oluşturulan apoptotik uyarıların etkisini azaltabileceği şeklinde yorumlanabilir. Bu nedenle EGFR TKI'ler ile birlikte STAT yolağı ve Mcl-1 ekspresyonunun baskılanmasına yönelik yaklaşımların tedavi başarısını artırabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak Türkiye'de ilk kez yapılan bu çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanserli olgularda EGFR geninde mutasyon oranı % 4, EGFR proteininde ekspresyon artış oranı ise % 46 olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışma ile EGFR ekspresyonunda artış gözlenen primer NSCLC tümör dokularında aynı zamanda PTEN proteini ekspresyon kaybı veya Mcl-1 proteini ekspresyon artışının da gözlenebileceği belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında daha fazla sayıda materyal ve farklı merkezlerde yapılacak çalışmalarla bu proteinlerin interaksiyonlarının moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına ve buna paralel olarak yeni biyolojik ajanların geliştirilmesine olanak sağlanabilecektir.

Tablo 5.1. NSCLC’li olgularda EGFR mutasyonlarının sıklığını bildiren yayınlar ve EGFR geni TK domain mutasyonlarının toplumlara göre dağılımı.

REFERANS	ÇALIŞILAN ÜLKE	MUTASYON SIKLIĞI
Paez J.G. 2004	Amerika birleşik devletleri Japonya	%2 %28
Pao W 2004	Amerika birleşik devletleri	%5
Kosaka T 2004	Japonya	%40
Shigematsu H 2005	Japondarda, Tayvan, ABD Avustralya, doğu asya diğer	%27 %34 %14 %8 %30 %8
Tokumo M 2005	Japonya	%32
Sugio K 2005	Japonya	%42.2
Murray S 2006	Yunanistan Çek cumhuriyeti	%12 %30
Nakatani K 2006	japonya	%27
Al-Kuraya K 2006	Suudi arabistan	%2.9
Suzuki M 2006	Japonya	%25.3
Ichihara S 2006	Japonya	%38.7
Bae NC 2007	Kore	%17
Wu Li-Yong 2007	Çin	%30
Han Sae-Won 2007	Kore	%23.3

KAYNAKLAR

1. Luiz Carlos Junkueir , jose Corneira. Basic Histology. Nobel Tıp Kitabevi . 2003; p. 359-368.
2. RL Souhami, Tannock I, Hahenberger H, Horiot JC. *Oxford textbook of Oncology Volume 2*. Oxford University pres 2002; p. 2067-2088.
3. http://www.toraks.org.tr/mesleki-kurslar-1-pptpdf/Tuncay_Göksel.pdf
4. Çevikbaş U. *Temel PAtiology*. Nobel Tıp Kitabevleri. 1995. p. 427-433.
5. Alberg AJ, Samet JM. *Epidemiology of lung cancer*. Chest. 2003;**123**(1 Suppl): p. 21-49.
6. Yoshino I, Kometani T, Shoji F, Osoegawa A, Ohba T, Kouso H, Takenaka T, Yohena T, Maehara Y. *Induction of epithelial-mesenchymal transition-related genes by benzo[a]pyrene in lung cancer cells*. Cancer. 2007;**110**(2): p. 369-374.
7. Vogelstein B, Kinzler KW. *The genetic basis of human cancer*. McGRAW-HILL Medical Publishing Division 2002: p. 731-739.
8. Pankiewicz W, Minarowski L, Niklińska W, Naumnik W, Nikliński J, Chyczewski L. *Immunohistochemical markers of cancerogenesis in the lung*. Folia Histochem Cytobiol. 2007;**45**(2): p. 65-74.
9. Ullmann R, Bongiovanni M, Halbwedl I, Petzmann S, Gogg-Kammerer M, Sapino A, Papotti M, Bussolati G, Popper HH. *Bronchiolar columnar cell dysplasia--genetic analysis of a novel preneoplastic lesion of peripheral lung*. Virchows Arch. 2003;**442**(5): p. 429-436.
10. Yamasaki M, Takeshima Y, Fujii S, Kitaguchi S, Matsuura M, Tagawa K, Inai K. *Correlation between genetic alterations and histopathological subtypes in bronchiolo-alveolar carcinoma and atypical adenomatous hyperplasia of the lung*. Pathol Int. 2000;**50**(10): p. 778-785.
11. Rosti G, Bevilacqua G, Bidoli P, Portalone L, Santo A, Genestreti G. *Small cell lung cancer*. Ann Oncol. 2006;**17** Suppl 2: p. 5-10.
12. Mitsuuchi Y, Testa JR. *Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer*. Am J Med Genet. 2002;**115**(3): p. 183-188.

13. Duarte RL, Paschoal ME. *Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking*. J Bras Pneumol. 2006;**32**(1): p. 56-65.
14. Shimmyo T, Okada A, Hashimoto T, Kobayashi Y, Miyagi Y, Ishikawa Y, Nakagawa K, Osada H, Tsuchiya E. *Etiologic value of p53 mutation spectra and differences with histology in lung cancers*. Cancer Sci. 2008;**99**(2): p. 287-295.
15. Mohamed S, Yasufuki K, Hiroshima K, Nakajima T, Yoshida S, Suzuki M, Sekine Y, Shibuya K, Lizasa T, Farouk A, Fujisawa T. *Prognostic implications of cell cycle-related proteins in primary resectable pathologic N2 nonsmall cell lung cancer*. Cancer. 2007;**109**(12): p. 2506-2514
16. Kraunz KS, Nelson HH, Lemos M, Godleski JJ, Wiencke JK, Kelsey KT. *Homozygous deletion of p16INK4a and tobacco carcinogen exposure in nonsmall cell lung cancer*. Int J Cancer. 2006;**118**(6): p. 1364-1369.
17. Mori S, Ito G, Usami N, Yoshioka H, Ueda Y, Kodama Y, Takahashi M, Fong KM, Shimokata K, Sekido Y. *p53 apoptotic pathway molecules are frequently and simultaneously altered in nonsmall cell lung carcinoma*. Cancer. 2004;**100**(8): p. 1673-1682.
18. Marsit CJ, Zheng S, Aldape K, Hinds PW, Nelson HH, Wiencke JK, Kelsey KT. *PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration*. Hum Pathol. 2005;**36**(7): p. 768-776.
19. Tang JM, He QY, Guo RX, Chang XJ. *Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis*. Lung Cancer. 2006;**51**(2): p. 181-191.
20. Grossi F, Loprevite M, Chiaramondia M, Ceppa P, Pera C, Ratto GB, Serrano J, Ferrara GB, Costa R, Boni L, Ardizzoni A. *Prognostic significance of K-ras, p53, bcl-2, PCNA, CD34 in radically resected non-small cell lung cancers*. Eur J Cancer. 2003;**39**(9): p. 1242-1250.
21. Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA, Tsao MS. *K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review*. Clin Lung Cancer. 2006;**8**(1): p. 30-38.
22. Liu Y, Gao W, Siegfried JM, Weissfeld JL, Luketich JD, Keohavong P. *Promoter methylation of RASSF1A and DAPK and mutations of K-ras, p53, and EGFR in lung tumors from smokers and never-smokers*. BMC Cancer. 2007;**7**:74.
23. Miller VA. *EGFR mutations and EGFR tyrosine kinase inhibition in non-small cell lung cancer*. Semin Oncol Nurs. 2008;**24**(1): p. 27-33.

24. Cappuzzo F. *Predictive factors for response and for resistance to tyrosine kinase inhibitor therapy in lung cancer.* J Thorac Oncol. 2007;**2**(5 Suppl): p. 12-14.
25. Wu M, Rivkin A, Pham T. *Panitumumab: Human monoclonal antibody against epidermal growth factor receptors for the treatment of metastatic colorectal cancer.* Clin Ther. 2008;**30**(1): p. 14-30.
26. Morgillo F, Bareschino MA, Bianco R, Tortora G, Ciardiello F. *Primary and acquired resistance to anti-EGFR targeted drugs in cancer therapy.* Differentiation. 2007;**75**(9): p. 788-799.
27. Besse B, Ropert S, Soria JC. *Targeted therapies in lung cancer.* Ann Oncol. 2007;**18** Suppl 9: p. 135-142.
28. Mitsudomi T, Yatabe Y. *Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer.* Cancer Sci. 2007;**98**(12): p. 1817-1824.
29. Hirsch FR, Scagliotti GV, Langer CJ, Varella-Garcia M, Franklin WA. *Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies.* Lung Cancer. 2003;**41** Suppl 1: p. 29-42.
30. Jing N, Tweardy DJ. *Targeting Stat3 in cancer therapy.* Anticancer Drugs. 2005;**16**(6):601-7.
31. Zhang X, Zhang J, Wei H, Tian Z. *STAT3-decoy oligodeoxynucleotide inhibits the growth of human lung cancer via down-regulating its target genes.* Oncol Rep. 2007;**17**(6):1377-82.
32. Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M. *Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy.* Drug Resist Updat. 2007;**10**(1-2):13-29.
33. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. *The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily.* Cytokine Growth Factor Rev. 2003;**14**(3-4):193-209.
34. Warr MR, Shore GC. *Unique biology of Mcl-1: therapeutic opportunities in cancer.* Curr Mol Med. 2008;**8**(2):138-47.
35. Michels J, Johnson PW, Packham G. *Mcl-1.* Int J Biochem Cell Biol. 2005;**37**(2):267-71.

36. Yang-Yen HF. *Mcl-1: a highly regulated cell death and survival controller*. J Biomed Sci. 2006;**13**(2):201-4.
37. Borner MM, Brousset P, Pfanner-Meyer B, Bacchi M, Vonlanthen S, Hotz MA, Altermatt HJ, Schlaifer D, Reed JC, Betticher DC. *Expression of apoptosis regulatory proteins of the Bcl-2 family and p53 in primary resected non-small-cell lung cancer*. Br J Cancer. 1999;**79**(5-6):952-8.
38. Sun S, Schiller JH, Spinola M, Minna JD. *New molecularly targeted therapies for lung cancer*. J Clin Invest. 2007;**117**(10): p. 2740-2750.
39. Dubey S, Powell CA. *Update in lung cancer 2006*. Am J Respir Crit Care Med. 2007;**175**(9): p. 868-874.
40. Danesi R, Pasqualetti G, Giovannetti E, Del Tacca M. *The role of pharmacogenetics in adjuvant treatment of non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol. 2007;**2**(5 Suppl):p. 27-30.
41. Olaussen KA, Mountzios G, Soria JC. *ERCC1 as a risk stratifier in platinum-based chemotherapy for nonsmall-cell lung cancer*. Curr Opin Pulm Med. 2007;**13**(4):284-289.
42. Thatcher N. *The place of targeted therapy in the patient management of non-small cell lung cancer*. Lung Cancer. 2007;**57** Suppl 2: p. 18-23.
43. Sarkaria IS, Zakowski MF, Pham D, Hezel M, Ebright MI, Chuai S, Venkatraman ES, Kris MG, Rusch VW, Singh B. *Epidermal growth factor receptor signaling in adenocarcinomas with bronchioloalveolar components*. Ann Thorac Surg. 2008;**85**(1): p. 16-23.
44. Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. *EGFR targeting of solid tumors*. Cancer Control. 2007;**14**(3): p. 295-304.
45. Bareschino MA, Schettino C, Troiani T, Martinelli E, Morgillo F, Ciardiello F. *Erlotinib in cancer treatment*. Ann Oncol. 2007;**18** Suppl 6: p. 35-41.
46. Karamouzis MV, Grandis JR, Argiris A. *Therapies directed against epidermal growth factor receptor in aerodigestive carcinomas*. JAMA. 2007;**298**(1): p. 70-82.
47. Borner MM, Brousset P, Pfanner-Meyer B, Bacchi M, Vonlanthen S, Hotz MA, Altermatt HJ, Schlaifer D, Reed JC, Betticher DC. *Expression of apoptosis regulatory proteins of the Bcl-2 family and p53 in primary resected non-small-cell lung cancer*. Br J Cancer. 1999;**79**(5-6): p. 952-958.
48. Song L, Coppola D, Livingston S, Cress D, Haura EB. *Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells*. Cancer Biol Ther. 2005;**4**(3): p. 267-276.

49. Ma Y, Cress WD, Haura EB. *Flavopiridol-induced apoptosis is mediated through up-regulation of E2F1 and repression of Mcl-1*. Mol Cancer Ther. 2003;**2**(1): p. 73-81.
50. Edwards A, Li J, Atadja P, Bhalla K, Haura EB. *Effect of the histone deacetylase inhibitor LBH589 against epidermal growth factor receptor-dependent human lung cancer cells*. Mol Cancer Ther. 2007;**6**(9): p. 2515-2524.
51. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med. 2004;**350**(21): p. 2129-2139.
52. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. *EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy*. Science. 2004;**304**(5676): p. 1497-1500.
53. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. *EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;**101**(36): p. 13306-13311.
54. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. *Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications*. Cancer Res. 2004;**64**(24): p. 8919-8923.
55. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD, Gazdar AF. *Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers*. J Natl Cancer Inst. 2005;**97**(5): p. 339-346.
56. Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, Shigematsu H, Tomii K, Aoe M, Ichimura K, Tsuda T, Yano M, Tsukuda K, Tabata M, Ueoka H, Tanimoto M, Date H, Gazdar AF, Shimizu N. *The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers*. Clin Cancer Res. 200;**11**(3): p. 1167-1173.
57. Sugio K, Uramoto H, Ono K, Oyama T, Hanagiri T, Sugaya M, Ichiki Y, So T, Nakata S, Morita M, Yasumoto K. *Mutations within the tyrosine kinase domain of EGFR gene specifically occur in lung adenocarcinoma patients*

with a low exposure of tobacco smoking. Br J Cancer. 2006;**94**(6): p. 896-903.

- 58.** Murray S, Timotheadou E, Linardou H, Vrettou AV, Kostopoulos I, Skrickova J, Papakostantinou C, Christodoulou C, Pectasides D, Samantas E, Papakostas P, Skarlos DV, Kosmidis P, Fountzilas G. *Mutations of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain and associations with clinicopathological features in non-small cell lung cancer patients.* Lung Cancer. 2006;**52**(2): p. 225-233.
- 59.** Nakatani K, Takao M, Nishioka J, Yasuda K, Noma K, Hayashi A, Wada H, Nobori T. *Association of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer with chemosensitivity to gefitinib in isolated cancer cells from Japanese patients.* Eur J Cancer Care (Engl). 2007;**16**(3): p. 263-270.
- 60.** Al-Kuraya K, Siraj AK, Bavi P, Al-Jommah N, Ezzat A, Sheikh S, Amr S, Al-Dayel F, Simon R, Guido S. *High epidermal growth factor receptor amplification rate but low mutation frequency in Middle East lung cancer population.* Hum Pathol. 2006;**37**(4): p. 453-457.
- 61.** Suzuki M, Shigematsu H, Iizasa T, Hiroshima K, Nakatani Y, Minna JD, Gazdar AF, Fujisawa T. *Exclusive mutation in epidermal growth factor receptor gene, HER-2, and KRAS, and synchronous methylation of nonsmall cell lung cancer.* Cancer. 2006;**106**(10): p. 2200-2207.
- 62.** Ichihara S, Toyooka S, Fujiwara Y, Hotta K, Shigematsu H, Tokumo M, Soh J, Asano H, Ichimura K, Aoe K, Aoe M, Kiura K, Shimizu K, Date H, Shimizu N. *The impact of epidermal growth factor receptor gene status on gefitinib-treated Japanese patients with non-small-cell lung cancer.* Int J Cancer. 2007;**120**(6): p.1239-1247.
- 63.** Bae NC, Chae MH, Lee MH, Kim KM, Lee EB, Kim CH, Park TI, Han SB, Jheon S, Jung TH, Park JY. *EGFR, ERBB2, and KRAS mutations in Korean non-small cell lung cancer patients.* Cancer Genet Cytogenet. 2007;**173**(2):107-113.
- 64.** Wu YL, Zhong WZ, Li LY, Zhang XT, Zhang L, Zhou CC, Liu W, Jiang B, Mu XL, Lin JY, Zhou Q, Xu CR, Wang Z, Zhang GC, Mok T. *Epidermal growth factor receptor mutations and their correlation with gefitinib therapy in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis based on updated individual patient data from six medical centers in mainland China.* J Thorac Oncol. 2007;**2**(5): p. 430-439.
- 65.** Han SW, Jeon YK, Lee KH, Keam B, Hwang PG, Oh DY, Lee SH, Kim DW, Im SA, Chung DH, Heo DS, Bang YJ, Kim TY. *Intron 1 CA dinucleotide repeat polymorphism and mutations of epidermal growth factor receptor and gefitinib responsiveness in non-small-cell lung cancer.* Pharmacogenet Genomics. 2007;**17**(5): p.313-319.

66. Sriuranpong V, Chantranuwat C, Huapai N, Chalermchai T, Leungtaweewoon K, Lertsanguansinchai P, Voravud N, Mutirangura A. *High frequency of mutation of epidermal growth factor receptor in lung adenocarcinoma in Thailand.* Cancer Lett. 2006;**239**(2): p. 292-297.
67. Haneda H, Sasaki H, Lindeman N, Kawano O, Endo K, Suzuki E, Shimizu S, Yukiue H, Kobayashi Y, Yano M, Fujii Y. *A correlation between EGFR gene mutation status and bronchioloalveolar carcinoma features in Japanese patients with adenocarcinoma.* Jpn J Clin Oncol. 2006;**36**(2):69-75.
68. Dziadziuszko R, Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr. *Selecting lung cancer patients for treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization--why, when, and how?* Clin Cancer Res. 2006;**12**(14 Pt 2): p. 4409-4415.
69. Dziadziuszko R, Holm B, Skov BG, Osterlind K, Sellers MV, Franklin WA, Bunn PA Jr, Varella-Garcia M, Hirsch FR. *Epidermal growth factor receptor gene copy number and protein level are not associated with outcome of non-small-cell lung cancer patients treated with chemotherapy.* Ann Oncol. 2007;**18**(3): p. 447-452.
70. Jeon YK, Sung SW, Chung JH, Park WS, Seo JW, Kim CW, Chung DH. *Clinicopathologic features and prognostic implications of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number and protein expression in non-small cell lung cancer.* Lung Cancer. 2006;**54**(3): p. 387-398.
71. Ahn JH, Kim SW, Hong SM, Suh C, Kim WK, Lee IC, Lee JS. *Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in operable non-small cell lung carcinoma.* J Korean Med Sci. 2004;**19**(4): p. 529-535.
72. Helfrich BA, Raben D, Varella-Garcia M, Gustafson D, Chan DC, Bemis L, Coldren C, Barón A, Zeng C, Franklin WA, Hirsch FR, Gazdar A, Minna J, Bunn PA Jr. *Antitumor activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839, Iressa) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with gene copy number and EGFR mutations but not EGFR protein levels.* Clin Cancer Res. 2006;**12**(23): p. 7117-7125
73. Dittadi R, Gion M, Pagan V, Brazzale A, Del Maschio O, Bargossis A, Busetto A, Brusca G. *Epidermal Epidermal growth factor receptor in lung malignancies. Comparison between cancer and normal tissue.* Br J Cancer. 1991;**64**(4):741-4.
74. Jeon YK, Sung SW, Chung JH, Park WS, Seo JW, Kim CW, Chung DH. *Clinicopathologic features and prognostic implications of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number and protein expression in non-small cell lung cancer.* Lung Cancer. 2006;**54**(3): p. 387-398.

75. Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, Kabasawa K. *Survival impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis*. Thorax. 2006;**61**(2): p. 140-145.
76. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, Lorimer I, Zhang T, Liu N, Daneshmand M, Marrano P, da Cunha Santos G, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J, Shepherd FA. *Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome*. N Engl J Med. 2005;**353**(2): p. 133-44.
77. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA Jr, Varella-Garcia M. *Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer*. J Natl Cancer Inst. 2005;**97**(9): p. 643-55
78. Kokubo Y, Gemma A, Noro R, Seike M, Kataoka K, Matsuda K, Okano T, Minegishi Y, Yoshimura A, Shibuya M, Kudoh S. *Reduction of PTEN protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to gefitinib (IRESSA)*. Br J Cancer. 2005 **92**(9):1711-9.
79. Endoh H, Yatabe Y, Kosaka T, Kuwano H, Mitsudomi T. *PTEN and PIK3CA expression is associated with prolonged survival after gefitinib treatment in EGFR-mutated lung cancer patients*. J Thorac Oncol. 2006;**1**(7):629-34.
80. Marsit CJ, Zheng S, Aldape K, Hinds PW, Nelson HH, Wiencke JK, Kelsey KT. *PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration*. Hum Pathol. 2005 ;**36**(7):768-76.
81. Lim WT, Zhang WH, Miller CR, Watters JW, Gao F, Viswanathan A, Govindan R, McLeod HL. *PTEN and phosphorylated AKT expression and prognosis in early- and late-stage non-small cell lung cancer*. Oncol Rep. 2007;**17**(4):853-7.
82. Krajewski S, Bodrug S, Krajewska M, Shabaik A, Gascoyne R, Berean K, Reed JC. *Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo*. Am J Pathol. 1995;**146**(6):1309-19.

83. Bae J, Leo CP, Hsu SY, Hsueh AJ. *MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain.* J Biol Chem. 2000;**275**(33):25255-61.
84. Li J, Viallet J, Haura EB. *A small molecule pan-Bcl-2 family inhibitor, GX15-070, induces apoptosis and enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells.* Cancer Chemother Pharmacol. 2008;**61**(3):525-34.
85. Weerasinghe P, Garcia GE, Zhu Q, Yuan P, Feng L, Mao L, Jing N. *Inhibition of Stat3 activation and tumor growth suppression of non-small cell lung cancer by G-quartet oligonucleotides.* Int J Oncol. 2007;**31**(1):129-36.
86. Motadi LR, Misso NL, Dlamini Z, Bhoola KD. *Molecular genetics and mechanisms of apoptosis in carcinomas of the lung and pleura: therapeutic targets.* Int Immunopharmacol. 2007;**7**(14):1934-47.
87. Venook AP. *Epidermal growth factor receptor-targeted treatment for advanced colorectal carcinoma.* Cancer. 2005;**103**(12):2435-46.

ÖZGEÇMİŞ

27.05.1978 tarihinde Antalya’da doğan Zafer ÇETİN, ilköğretimini 1985-1989 yılları arasında Gazi İlköğretim Okulunda tamamlamıştır. Orta öğrenimini 1989-1992 yılları arasında Gazi Çiftliği Lisesinde, Lise Öğrenimini 1992-1995 yılları arasında Aydınlıkevler Lisesinde yapmıştır. 1995-1999 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Fen ve Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü lisans programını tamamlamıştır. 1999-2002 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Tıbbi Genetik yüksek lisans programına kayıt olmuş ve aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak göreve başlamıştır. 2002 yılında yüksek lisans programından mezun olmuş ve aynı anabilim dalında Tıbbi Genetik doktora programına başlamıştır.

EKLER



Available online at www.sciencedirect.com



Annales de génétique 47 (2004) 129–138

ANNALES
DE GÉNÉTIQUE

www.elsevier.com/locate/anngen

Consanguineous marriages in the province of Antalya, Turkey ☆

Ö.M. Alper ^{a,*}, H. Erengin ^b, A. E Manguoğlu ^a,
T. Bilgen ^a, Z. Çetin ^a, N. Dedeoğlu ^b, G. Lüleci ^a

^a Department of Medical Genetics, School of Medicine, Akdeniz University, Antalya 07070, Turkey

^b Department of Public Health, School of Medicine, Akdeniz University, Antalya 07070, Turkey

Received 28 February 2003; accepted 9 September 2003

Available online 23 October 2003

Abstract

To assess the trends in the frequency and the medical effects of consanguinity in the south coast of Turkish population using local and national data in the last 11 years. This cross-sectional study was carried out in Manavgat province, which is a major tourism center on the Mediterranean coast of Turkey. The authors studied consanguineous marriages in rural and urban population in the Mediterranean coast, Manavgat province, Turkey, via a 1500 random survey sample of married couples. There has been a significant increase in the incidence of consanguineous marriages in rural areas (40.7%) since 1989 in the southern population of Turkey. The results showed that the most frequent type of marriage was between the first cousins. It is found that there is no statistically significant difference between the consanguineous and non-consanguineous marriages in the different age groups. The results were discussed on the basis of educational status, reasons for having consanguineous marriages and the general medical effects as well as with the relation of congenital malformations. The custom of consanguineous unions in the Mediterranean population of Turkey is still extremely high, and preventive measures should be done to decrease its frequency and associated complications.

© 2003 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Consanguinity; Marriage/statistics population surveillance; Epidemiology; Turkey

☆ This study was supported by the Turkish Manavgat Rotary Club Foundation, Antalya, Turkey.

* Corresponding author. Present address: Institute for Molecular and Human Genetics, Georgetown University Medical Center, LCC M4000, 3800 Reservoir Road, NW, Washington, DC 20007, USA.

E-mail address: oa8@georgetown.edu (M. Alper).

1. Introduction

Consanguineous marriages not only have a greater risk of producing offspring which are homozygous for a deleterious recessive gene, but also individuals with increased susceptibility for polygenic or multifactorial diseases, sterility, stillbirths, spontaneous abortions, child deaths, infant mortality, as well as congenital malformations [8,17,25].

The frequency of consanguineous marriages has decreased considerably over the past few years, but such marriages are still very common in certain areas of the world. Consanguineous marriages can be seen all over the different ethnic and religious groups to a varying degree. Among Muslims, religious traditions are the least commonly cited reason for such marriages and, in general, parents are the prime decision-makers for marriages of both sons and daughters [12,15].

The screening of consanguineous marriages in Turkey was first conducted by Şaylı in 1969 and still constitutes a major problem in Turkey and other investigations are summarized in Table 1. These studies indicate that the frequency of consanguineous marriages ranged from 11.5% to 46% overall in the eastern part and that the ratio decreased to 11.7% in the western parts of the country [5,22] which is shown in Fig. 1. Studies on the prevalence of consanguinity in Antalya region, Mediterranean coast, were initiated by Güz in 1989. The total was found to be 35.2%, while 39.4% in the rural and 28.3% in the urban areas were observed recently [10].

We, therefore, decided to establish the ratio and the factors involved in consanguineous marriages in Manavgat, near Antalya, which is a major tourism center on the Mediterranean coast of Turkey. We were expecting to find a low level of prevalence of consanguinity in this region, because of a high level of economic development as well as increasing level of urbanization. We also compared the importance of the subject in terms of health education and health care.

2. Materials and methods

This cross-sectional study was carried out in Manavgat province on the Mediterranean coast of Turkey (near Antalya), which had a total population of 78,635 in 2001. There were a total of 26,931 unmarried and married women between the ages of 20 and 44 in Manavgat, according to the Manavgat Health Center records. For the selection of samples, the cluster-sampling method was used to achieve statistically significant data [6]. Based on calculations, the rate of homogeneity (roh) value was 0.3, the design effect was 5.2 and the standard deviation was 0.03. Each cluster consisted of 15 households. The *P* value was taken as 35% due to the previous consanguinity screening study in Antalya by Güz, in 1989. A total of 1500 urban and rural married women were selected. Those who were born in Manavgat were included in the study, and were interviewed by one of the authors at woman's home. During each home visit, a questionnaire was completed, which included age, level of education, relation with husband, reasons for marriage with a relative reproductive performance, outcome of pregnancy, child deaths and congenital malformations among living and dead children. Rural areas are defined as regions of farming where villages are present; urban areas are the centers or parts of cities. During the survey; a total

Table 1
Consanguinity screening research results in Turkey

Year	Author	Regions of Turkey	Number of families	Percent of consanguinity
1969	Şaylı	Ankara	762	27.8
		Ordu	163	27.4
		Sivas	292	31.6
		Turkey	1000	28.4
1972	Başaran	Ankara	597	26.1
		Diyarbakır	2110	37.1
		Other	620	30.0
		Turkey	3327	33.8
1973	Başaran	Diyarbakır	490	34.3
1983	Başaran	Ankara	642	28.04
		Diyarbakır	11,194	35.02
		Eskişehir	14,584	16.32
		Turkey	26,420	24.53
1983	Şaylı	Ankara	5000	31.24
1983	Sezgin	Izmir	10,857	13.77
1985	Budak	Diyarbakır	458	46.9
1987	Ulusoy Tunçbilek	West	2,681,990	11.55
		South	997,640	31.02
		Middle	1,839,960	25.90
		North	935,450	23.91
		East	1,416,880	34.98
		Turkey	7,872,120	23.06
1989	Güz Başaran	Antalya	2604	35.2
		Turkey	56,664	21.25
1990	Özdemir	Sivas		26.42
1992	Tümerdem Baki	Istanbul	4240	15.45
		Trabzon	999	20.0
1993	Kılıçarslan	Sivas	723	27.52
1995	Düzcan	Sivas	1000	23.5
1997	Demirel	Konya	1120	23.2
1999	Şimşek	Denizli	1000	11.7

of 17 individuals did not answer the questions which had no significant effect on the results. In this study, marriages were classified into three groups; first cousin marriages (children of parent), other consanguinity (half-first and the second degree cousins, distant consanguineous marriages, if known) and non-consanguineous marriages. The data were hand coded and processed by an IBM computer using EpiInfo version 5.0 and SPSS statistical programs. Chi square test and Student's *t*-test were used to test the significance of the results.

3. Results

The results showed that for Manavgat, Turkey, the overall frequency of consanguinity was 24.2% in urban, and 40.7% in rural areas, and the total rate of consanguinity was found to be 33.9% (Table 2). The most frequent consanguinity type was first cousins: which was

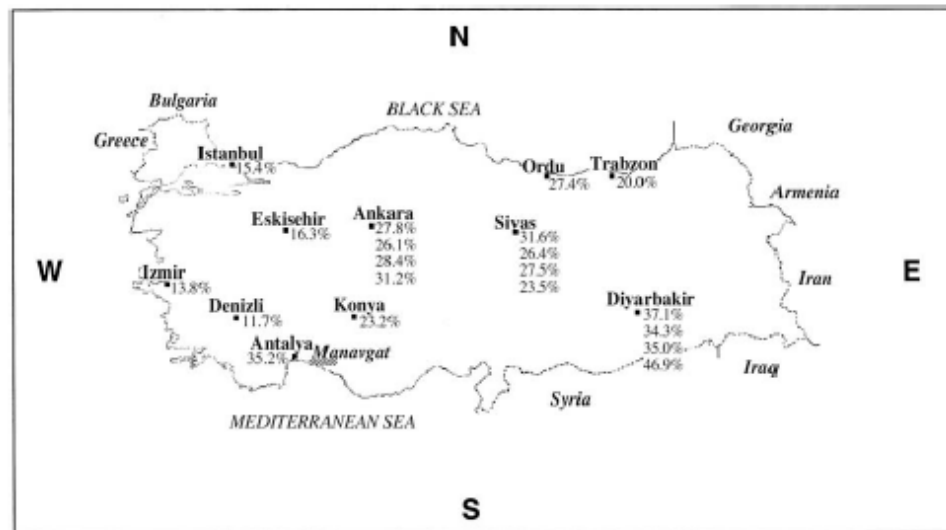


Fig. 1. General frequency of consanguineous marriages all over the Turkish population, between the period of 1969 and 1999.

about 15.7% in the rural areas. This was followed by other consanguinities (25.0%) and non-consanguineous marriages (59.3%). The frequency of consanguinity in the urban areas was much lower than that of the rural areas. According to the survey, married women included in the study fall into five age groups which are shown in Table 3. Our data show that there is no statistically significant difference between the consanguineous and non-consanguineous marriages in the different age groups. Younger women married their

Table 2
Number and frequency of consanguineous marriages according to regions

Region	First cousin, <i>n</i>	Percent	Other consanguineous, <i>n</i>	Percent	Non-consanguineous, <i>n</i>	Percent	Total, <i>n</i> (%)
Urban	53	8.6	96	15.6	467	75.8	661 (41.0)
Rural	139	15.7	221	25.0	524	59.3	884 (58.0)
Total	192	12.8	317	21.1	991	66.1	1500 (100.0)

$$\chi^2 = 44.29, P = 0.0000000$$

Table 3
Frequency of consanguinity among different age groups of women

Age	First cousin, <i>n</i> (%)	Other consanguineous marriages, <i>n</i> (%)	Non-consanguineous marriages, <i>n</i> (%)	Total, <i>n</i> (%)
20–24	21 (12.4)	39 (23.1)	109 (64.5)	169 (11.3)
25–29	37 (11.9)	69 (22.3)	204 (65.8)	310 (20.7)
30–34	42 (13.0)	63 (19.6)	217 (67.4)	322 (21.5)
35–39	42 (12.4)	64 (18.9)	233 (68.7)	339 (22.6)
40–44	50 (13.9)	82 (22.8)	228 (63.3)	360 (24.0)
Total	192 (12.8)	317 (21.1)	991 (66.1)	1500 (100.0)

$$\chi^2 = 2.7, P = 0.605.$$

relatives just as much as older women did. This also implies that there were no differences in marriage customs during the last 28 years.

On the basis of educational status, our data showed that consanguineous marriages decreased among women with secondary or higher education and was significantly increased in woman with only primary education and were illiterates (Table 4).

The underlying causes of inbreeding are summarized in Table 5. Family pressure was determined as the second main factor in both urban and rural areas of this region.

Based on the survey, reproductive behavior among women in consanguineous (first cousin) and non-consanguineous marriages was compared and is shown in Table 6. The average pregnancies per mother in consanguineous and non-consanguineous marriages were 2.89 ± 1.17 and 2.44 ± 1.16 , respectively ($t = 5.00$, $P = 0.000$). There were no differences in the mean numbers of spontaneous abortions and stillbirths between the two groups. As can be seen in Table 7, the congenital malformation rate in consanguineous

Table 4
Frequency of consanguinity according to educational level

Educational level (year)	Consanguineous marriages, n (%)	Non-consanguineous marriages, n (%)	Total, n (%)
None	78 (39.4)	120 (60.6)	198 (13.2)
<5	388 (36.6)	672 (63.4)	1060 (70.7)
6–8 ***	14 (20.0)	56 (80.0)	70 (4.7)
9–11 *	26 (18.1)	118 (81.9)	144 (9.6)
>11 **	3 (10.7)	25 (89.3)	28 (1.8)
Total	509 (33.9)	991 (66.1)	1500 (100.0)

* $P = 0.00000047$, $\chi^2=34.99$.

** $P = 0.00083$, $\chi^2=16.70$.

*** $P = 0.0116$, $\chi^2=8.91$.

Table 5
Underlying causes of consanguinity in rural and urban areas of Manavgat

Reasons for marriage with a relative	Urban, n (%)	Rural, n (%)	Total, n (%)
Economic	1 (0.7)	2 (0.5)	3 (0.6)
Family pressure	63 (42.6)	90 (25.1)	152 (30.2)
Love	77 (52.0)	267 (74.4)	344 (67.8)
Other causes	7 (4.7)	0 (0.0)	7 (1.4)
Total	148 (29.2)	359 (70.8)	507 (100.0)

Table 6
Medical effects of consanguinity

	First cousin, m (S.D.)	Other consanguineous marriages, m (S.D.)	Non-consanguineous marriages, m (S.D.)	Total, m (S.D.)
Number of pregnancies	2.90 (1.80)	2.89 (1.69)	2.44 (1.61)	2.60 (1.66)
Number of live births	2.49 (1.54)	2.38 (1.37)	2.04 (1.27)	2.17 (1.34)
Spontaneous abortions	0.35 (1.00)	0.42 (1.02)	0.37 (1.17)	0.38 (1.13)
Number of stillbirths	0.06 (0.26)	0.09 (0.09)	0.51 (0.29)	0.06 (0.31)

m stands for mean value, S.D. stands for standard deviation.

Table 7

Rate of congenital malformations in all children born to the family in consanguineous marriages

	Presence of congenital malformations, <i>n</i> (%)	Absence of congenital malformations, <i>n</i> (%)
Consanguineous	60 (11.8)	49 (88.2)
Non-consanguineous	45 (4.5)	946 (95.5)
Total	105 (7.0)	1395 (93.0)

 $\chi^2 = 26.03$, $P = 0.0000003$.

Table 8

Main medical effects of consanguinity

	Percent
Mental retardation	15.3
Non-syndromic deafness and speech disorders	14.3
Ophthalmic anomalies	12.4
Multiple malformations	11.4
Cardiac anomalies	8.6
Hemoglobinopathies	7.6
Others	30.4
Total	100.0

marriages was higher than that of the unrelated families. The types of congenital malformations are summarized in Table 8.

4. Discussion

Consanguineous marriages occurred among Muslims, Christians and Hindus to a varying degree within the sub-groups of each religion. Consanguineous unions are strongly preferred in much of west and south Asia and also have both a social and an economic impact in the population groups that practice this type of marriage [2,9,14,16,23,24]. Generally, it is widely favored in a large majority of the world's Islamic populations, like Pakistan, India. Ninety-nine percent of the Turkish population is Muslim, and Islam in Turkey is a much gentler religion when compared to other Muslim countries.

Turkey, Anatolia, is a sort of gravitational center between the west and east, a point of junction between continental Europe and Afro-Asian continent. Anatolia is composed of mainly four regions, each region having different traditions and family structure. These have strong influences on the prevalence of inbreeding in Turkey [11,12,22]. Up to date, various factors are found to be main reasons for having high incidence of consanguineous marriages in Turkey.

The general rate of frequency on consanguinity ranges from 11.5% to 46% in the Turkish population (Fig. 1). Although consanguineous marriage is widespread, it is particularly common in the eastern and south eastern regions, depending on various factors such as socioeconomic status, and strong conservative traditional influence and origin (unpublished observation) [7,12]. Reports to date indicate that the prevalence of consanguineous marriages is highest in eastern Anatolia (30–40%) when compared to the regions

of western Anatolia (11–13%). Ulusoy and Tunçbilek [22] have estimated an 8.3% reduction between the years in 1968 and 1983 in the overall consanguinity rates in the Turkish population [6,21]. In both surveys, the prevalence of consanguineous unions appeared to be unchanged over the past 20–30 decades.

As a population characteristic of Turkey, most of its Mediterranean population had been living in small, isolated villages for about 80 decades. Considerable migration began from villages to big cities about 20 years ago. More interestingly, the Mediterranean population of Turkey is under the influence of several factors including tourism, urbanization, economy, farming, etc. As our survey is carried out in Manavgat, Antalya, a low prevalence of consanguinity was expected towards the year 2000. Due to the previous data published by Güz in 1989, it was expected that increasing urbanization, tourism, higher levels of education, modern trends and smaller families would help to decrease the level of consanguinity in Antalya [10]. Although this specific region is mainly under the influence of development, a significant increase in the incidence of consanguineous marriages over the years has been observed [5,10]. However, only few surveys were done to learn about the impact of industrial development on consanguinity of the Turkish population. This approach is worth analyzing in Turkey, where industrialization was late in relation to other eastern European countries. According to the records of the Turkish Institute of Population Research Center (TIPRC), the migration to the Mediterranean coast was 2.16% between the period of 1990 and 2000. As Antalya is one of the rapidly growing cities in the Mediterranean coast of Turkey when compared to overall population, the increase rate is around 1.83%, in the same period. Our region, Manavgat province, underwent industrial and tourist development earlier than other Mediterranean regions. It has the highest density of population and occupied a central position geographically. As the consanguinity rate is significantly high, the disadvantages of the consanguineous marriages will be understood by time, and the economic progress still has no effect in these social areas, unless it will be seen in the future generations (unpublished observation).

There was no difference in the frequency of consanguineous marriages among the 20–44-year-old women and their number of pregnancies. The traditional customs did not change over the past years and there was no effect on the consanguineous marriages. Our data correlate with the findings of Güz, in Antalya and other studies in the Turkish population [3,7,10]. However, in Pakistan, which is a well-studied Muslim country, consanguineous marriages were found to be more frequent at ages below 18 and having higher number of pregnancies, also reported a higher mean number of children, which correlates with some of the investigations in the Turkish population [15,19].

Consanguineous unions were more common among women who are illiterate or had only primary level education, or living in rural areas and whose parents were also consanguineous. Our study shows that the consanguinity level significantly decreases among women with secondary education and among university graduates. Our results are confirmed by other studies previously performed in the Turkish population [3,7,19] and strongly correlates with other Muslim countries survey results [14,16,23]. Maternal education is strongly associated with increase in maternal age and also one of the major determinants for the future of inbreeding in most of the populations.

Up to date, population specific national surveys showed that various factors are playing a role in consanguineous unions. One of the main factors is the lack of suitable mates

outside the family. This is due to geographical localization like in rural areas, or cultural isolation, so that marriage to a relative may be the only possibility. Most of the consanguineous couples more frequently lived in smaller towns and in an extended family environment. Another important reason is the preservation of property, especially land, and the desire to keep it within the family. A third reason is the popular belief that intra-familial marriage offers advantages in terms of compatibility of the bride with her husband's family, where the bride finds it reassuring to marry into a known family background. Family pressure and falling in love are the major reasons stated for consanguinity in our study. Family pressure indicates a coercion by parents to marry relatives so that property is kept within the family, which may be mainly correlated with the economical status. Findings suggest that consanguinity is a social concern for the well being of the family and daughter. Economic factors may be more prevalent in rural areas.

The main risk of non-random marriages, which increases with the degree of consanguinity, is the expression in the offspring of various autosomal recessive disorders. This occurs because both parents may be carriers of the same deleterious gene. As a result, such marriages have a significant implication for recessive diseases, congenital malformations and decreased reproductivity. They also have both a social and an economic impact in the population groups that practice this type of marriage [17]. With regard to the effect of consanguinity on reproductivity, the findings are conflicting. Several authors have reported a significant increase in sterility and in the rate of abortions, stillbirths, perinatal losses and neonatal deaths in consanguineous families both in Turkey and other Muslim countries [3,4,11,13,20]. Whereas, others have found that consanguinity had either no or only a slight, not statistically significant, effect on these parameters. Therefore, our results are similar with one of the national surveys which was held in one of the closest cities in the Mediterranean coast [7]. Differences might be caused by misunderstanding by the mothers of the definitions in the questionnaire independent of maternal education. Although the effect of consanguinity on past reproductive wastage was not found to be significant, it was definitely associated with increased incidence of congenital malformations. The significant association has also been described from other parts of the Muslim world [1,2,13]. Several studies have shown that the rate of congenital malformations among the offspring of consanguineous marriages is approximately 2.5 times higher than that among the offsprings of unrelated parents. A similar rate (2.6) was observed in our study [18] (Table 6). The malformations which have been found to be common are as follows: cardiovascular, those relating to central nervous system, ophthalmic, urogenital, gastrointestinal, skeletal, cutaneous abnormalities and also multiple malformations [4].

In our survey, we found that the rate of hemoglobinopathies at 7.60% for thalassemia, 0.90% for the carriers of sickle cell anemia and 14.3% for non-syndromic deafness and speech disorders (Table 7). Somewhat conflicting results were obtained in relation to reproductive wastage, but the overall picture suggested that it has a significant relationship with the occurrence of various congenital malformations and developmental disorders. As this is a high ratio for Manavgat, we believe that a genetic screening program for carriers is critical. This should allow for premarital and prenatal testing, provide prenatal and genetic counselling services, and educate as many young people as possible. There were some restrictions in our study which may affect the results. The survey was carried out using a pre-structured questionnaire, distorted answers to questions, such as not telling the truth

about having a child with mental retardation and similar others. Moreover, medical records of families in Health centers of Manavgat province were not available to include in our study.

In conclusion, consanguineous marriages may be considered as an indicator of traditional behaviors, and are mostly practised among people who marry at a younger age and with lower educational level. As the consanguinity distribution is not homogenous all over the country, the relative carrier frequency of recessive genes is expected to be higher in the southern and the eastern parts of Turkish population. All health workers, professionals, as well as family members should be aware of the dangers, and try to reduce the burden of consanguinity.

Acknowledgements

We thank all the subjects of our investigation and their families for the time they generously gave us. We would like to thank Dr. Wayne Criss for the comments that helped to shape the final presentation.

References

- [1] S.S. Agarwal, U. Singh, P.S. Singh, S.S. Singh, V. Das, A. Sharma, P. Mehra, Chandravati, G.K. Malik, G.K. Misra, Prevalence and spectrum of congenital malformations in a prospective study at a teaching hospital, *Indian J Med Res* 94 (1991) 413–419.
- [2] M. Al-Salem, N. Rawashdeh, Consanguinity in North Jordan prevalence and pattern, *J. Biosoc. Sci.* 25 (1993) 553–556.
- [3] A. Baki, A. Karagüzel, E. Beşer, T. Çakmakçı, F. Uçar, A. Ömeroğlu, Consanguineous marriages in the province of Trabzon, Turkey, *East African Med. J.* 69 (1992) 94–96.
- [4] N. Başaran, H. Hassa, A. Başaran, S. Artan, J.D. Stevenson, B.S. Şaylı, The effect of consanguinity on the reproductive wastage in the Turkish population, *Clin. Genet.* 36 (1989) 168–173.
- [5] N. Başaran, B.S. Şaylı, A. Başaran, M. Solak, S. Artan, J.D. Stevenson, Consanguineous marriages in the Turkish population, *Clin. Genet.* 4 (1998) 339–341.
- [6] S. Bennet, T. Woods, W.M. Liyanage, D.L. Smith, A simplified general method for cluster-sample survey of health in developing countries, *World Health Stat. Q.* 44 (1991) 98–106.
- [7] S. Demirel, N. Kaplanoğlu, A. Acar, S. Bodur, F. Paydak, The frequency of consanguinity in Konya, Turkey and its medical effects, *Genet. Counsel.* 8 (1997) 295–301.
- [8] A.E.H. Emery, *Methodology in Medical Genetics*, Churchill Livingstone Press, Edinburgh, 1976.
- [9] E. Genin, F. Clerget-Darpose, Association studies in consanguineous populations, *Am. J. Hum. Genet.* 58 (1996) 861–866.
- [10] K. Güz, N. Dedeoğlu, G. Lülecı, The frequency and medical effects of consanguineous marriages in Antalya-Turkey, *Hereditas* 111 (1989) 79–83.
- [11] A. Hancıoğlu, E. Tunçbilek, Socio-demographic characteristics of consanguineous marriages and their effects on childhood mortality in Turkey, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 41 (1989) 139–153.
- [12] A. Hancıoğlu, B. Akadlı Ergöçmen, Some social aspects of Turkish marital unions and their relationship with early age mortality, *NüfusBil. Derg.* 14 (1992) 3–25.
- [13] R. Hussain, The impact of consanguinity and inbreeding on perinatal mortality in Karachi, Pakistan, *Paediatr. Perinatol. Epidemiol.* 12 (1998) 370–382.
- [14] R. Hussain, A.H. Bittles, The prevalence and demographic characteristic of consanguineous marriages in Pakistan, *J. Biosoc. Sci.* 30 (1998) 261–275.

- [15] R. Hussain, A.H. Bittles, Consanguineous marriage and differentials in age at marriage, contraceptive use and fertility in Pakistan, *J. Biosoc. Sci.* 31 (1999) 121–138.
- [16] R. Hussain, A.H. Bittles, Sociodemographic correlates of consanguineous marriage in the Muslim population of India, *J. Biosoc. Sci.* 32 (2000) 433–442.
- [17] A.G. Motulsky, F. Vogel, *Human Genetics, Problems and Approaches*, Springer-Verlag, Berlin, 1982.
- [18] B. Say, Türk halkında cesitli konjenital malformasyonların görölme sikligi (The frequency of congenital malformations in Turkish population), Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 1971 C-12.
- [19] S. Şimşek, M. Türe, B. Tuğrul, N. Mercan, H. Türe, B. Akdağ, Consanguineous marriages in Denizli, Turkey, *Ann. Hum. Biol.* 26 (1999) 489–491.
- [20] E. Tunçbilek, I. Koç, Consanguineous marriage in Turkey and its impact on fertility and mortality, *Ann. Hum. Genet.* 58 (1994) 321–329.
- [21] E. Tunçbilek, Clinical outcomes of consanguineous marriages in Turkey, *Turk. J. Pediatr.* 43 (2001) 277–279.
- [22] M. Ulusoy, E. Tunçbilek, Consanguineous marriages in Turkey and their effects on child death, *Nüfusbilim Der.* 9 (1987) 7–26.
- [23] R. Vardi-Salitermik, Y. Friedlander, T. Cohen, Consanguinity in a population sample of Israeli Muslim Arabs, Christian Arabs, and Druze, *Ann. Hum. Biol.* 29 (2002) 422–431.
- [24] A. Wahab, M. Ahmad, Biosocial perspective of consanguineous marriages in rural and urban Swat, Pakistan, *J. Biosoc. Sci.* 28 (1996) 305–313.
- [25] J. Zlotogora, Problems in diagnosis and delineation of inherited disorders in highly inbred populations, *Am. J. Med. Genet.* 41 (1991) 451–453.

M-FISH APPLICATIONS IN CLINICAL GENETICS

BY Z. ÇETİN¹, S. BERKER KARAÜZÜM¹, S. YAKUT¹, E. MIHÇI², A. BAUMER³,
E. WEY³, Ş. TAÇOY², G. BAĞCI¹ AND G. LÜLECI¹

Summary: *M-FISH applications in clinical genetics:* Until recently, presence of *de novo* marker or derivative chromosomes was quite problematic for genetic counseling especially in prenatal diagnosis, because characterization of marker and derivative chromosomes by conventional cytogenetic techniques was nearly impossible. However, recently developed molecular cytogenetic technique named Multicolor Fluorescence In Situ Hybridization (M-FISH) which paints all human chromosomes in 24 different colors allows us to characterize marker and derivative chromosomes in a single hybridization. In this study, we applied M-FISH to determine the origin of 3 marker and 3 derivative chromosomes. Marker chromosomes were found to originate from chromosome 15 in two postnatal and one prenatal case. Of these, one of the postnatal cases displayed clinical findings of inv dup (15) syndrome and the other of infertility, and the prenatal case went through amniocentesis due to the triple test results. Karyotypes of the patients with derivative chromosomes were designated as 46,XY,der(21)t(1;21)(q32;p11), 46,XX,der(8)t(8;9)(p23;p22) and 46,XX,der(18)t(18;20)(q32;p11.2) according to cytogenetic and M-FISH studies. All of the M-FISH results were confirmed with locus specific or whole chromosome painting probes. The case with der(8)t(8;9) had trisomy 9(p22-pter) and monosomy 8(p23-pter) due to this derivative chromosome. The case with der(18)t(18;20) had trisomy 20(p11.2-pter) and monosomy 18(q32-qter). Parental origins of the derivative chromosomes were analyzed using microsatellite markers located in the trisomic chromosomal segments. Patients' clinical findings were compared with the literature.

Key-Words: Marker chromosomes – Derivative chromosomes – M-FISH – Parental origin.

INTRODUCTION

Marker chromosomes can originate from any chromosome and a majority originate from acrocentric chromosomes, especially from chromosomes 15 and 22 (18, 20). Because of the great variety and a scarcity of the marker chromosomes derived from some of the chromosomes, there are few well established karyotype-phenotype correlations including Cat Eye syndrome, Pallister Killian syndrome, i(18p) and inv dup (15) syndromes (2, 4, 28). *De novo* marker and derivative chromosomes represent major diagnostic and counseling problems in clinical genetics because their chromosomal origins can not be identified using conventional banding techniques (19).

Development of molecular cytogenetic techniques based on Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) allowed detection of the origins and genetic contents of marker chromosomes. Several marker chromosomes were characterized by FISH studies using panels of whole chromosome painting (WCP) or centromere specific probes and reverse chromosome painting which are time and material consuming (28). Recently developed multicolor karyotyping (M-FISH), a technique based

(1) Akdeniz University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics, Antalya, Turkey.

(2) Akdeniz University, Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Antalya, Turkey.

(3) Institute of Medical Genetics, University of Zurich, Schorenstr. 16, CH-8603 Schwerzenbach, Switzerland.

on the combinatorially labeling of the chromosome specific probes with five different fluorophores, provides simultaneous detection of the 24 human chromosomes in different colors (14). Therefore, M-FISH has enabled the rapid identification of complex karyotypes, marker and derivative chromosomes in different cell types in a single hybridization (31).

The goals of this study were identification of chromosomal origins of marker and derivative chromosomes of 6 cases found to have marker or derivative chromosomes during routine cytogenetic studies and to evaluate karyotype and phenotype correlations in these cases. Also, by determining the allelic origins of the trisomic segments we tried to find out a possible specificity for parental origins and mechanisms of formation of the derivative chromosomes.

MATERIALS AND METHODS

CYTOGENETIC STUDIES

Patients' metaphase spreads were prepared either from short-term phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures or amniocyte cultures. Metaphase chromosomes were banded with GTG. Twenty and 100 GTG banded metaphases were analyzed in cases with derivative and marker chromosomes respectively. C-banding and NOR-banding were performed according to the standard protocols to the metaphase chromosomes of the patients carrying marker chromosomes. Parental karyotypes were also analyzed with GTG-banding.

M-FISH STUDIES

M-FISH studies were performed to detect the origins of the markers and additional materials on the derivative chromosomes using spectravision assay probe mix (Vysis) according to manufacturer's instructions. Images were recorded using a Zeiss Axioplan epifluorescence microscope equipped with a CCD camera (Photometrics Sensys) and analysed using PowerGene M-FISH software (Applied Imaging). At least 10 metaphases were analyzed for each case.

FISH STUDIES WITH WHOLE CHROMOSOME PAINTING AND LOCUS SPECIFIC PROBES

FISH analysis using chromosome painting probes specific to the chromosomes 1, 9, 15 and 20 (Vysis) and PWS/AS locus specific probes (Vysis) were performed according to manufacturer's instructions. Images were recorded using a Zeiss Axioplan epifluorescence microscope equipped with a CCD camera (Photometrics Sensys) and analysed using MacProbe v 4.3 software. At least 10 metaphases were analyzed for each case.

MICROSATELLITE ANALYSIS

Genomic DNAs of patients 4, 5 and 6 were isolated from blood by salting-out procedure (27). Microsatellite markers used in parental origin analyses were; D1S102, D1S205, D1S1609, D1S1656, D9S132, D9S144, D9S156, D9S157, D9S162, D9S168, D9S199, D9S269, D9S286, D9S288, D20S27, D20S40, D20S48, D20S56, D20S59, D20S66, D20S194, D20S917. Between 200-500 ng of DNA were amplified in a volume 25 µl. The amplification was performed with 35 cycles of 30 seconds at 94° C, 45 seconds at 55-60° C for annealing and one minute at 72° C for extension. The products were mixed with urea loading buffer and loaded on a 6% polyacrylamide gel and visualized by silver staining.

CLINICAL REPORTS AND RESULTS

Ages, parental ages and karyotypes, and clinical findings of the patients are shown in Table I. Results of cytogenetic, M-FISH and other FISH studies are shown in Table II. Results of the microsatellite DNA marker analyses are shown in Table III.

Table I: Summary of age, parental ages and karyotypes and clinical findings.

Case N°	Age	Maternal Age	Paternal Age	Parental Karyotype	Clinical Findings
1	1	40	39	Normal	MR, hypotonia, seizures
2	Fetus	40	39	Normal	High triple test result
3	39	60	64	Normal	Infertility
4	8 months	22	28	Normal	MCA
5	8	44	42	Normal	MCA
6	5	21	23	Normal	MCA

MR: Mental Retardation, MCA: Multiple Congenital Anomaly.

Table II: Results of cytogenetic, M-FISH and other FISH studies.

Case No	Karyotypes	M-FISH results	Other FISH Studies	Final Karyotypes
1	47, XY, +mar[100]	47, XY, +mar(15)	WCP-15 (+) PWS/AS (+)	47, XY, 1qh+, +inv dup(15)(pter;q12)
2	47, XX, +mar[100]	47, XX, +mar(15)	WCP-15 (+) PWS/AS (-)	47, XX, +inv dup(15)(pter;q11)
3	47, XY, +mar[100]	47, XY, +mar(15)	WCP-15 (+)	47, XY, +der(15)(p11;q11)
4	46, XY, add(21)(p11) [20]	46, XY, der(21)t(1;21)	WCP-1 (+)	46, XY, der(21)t(1;21)(q32;p11)
5	46, XX, add(8)(p23) [20]	46, XX, der(8)t(8;9)	WCP-9 (+)	46, XX, der(8)t(8;9)(p23;p22)
6	46, XX, add(18)(q32) [20]	46, XX, der(18)t(18;20)	WCP-20 (+)	46, XX, der(18)t(18;20)(q32;p11.2)

Table III: Microsatellite DNA marker analyse results of the cases 4, 5 and 6.

46, XX, der(8)t(8:9)(p23;p22) mat; 46, XX, der(18)t(18:20)(q32;p11.2) pat; 46, XY, der(21)t(1:21)(q32;p11) mat

Marker	M/P/F	Marker	M/P/F	Marker	M/P/F
D9S144	ab/ <u>abh</u> / bc	D20S40	ab/ bb/ ab	D1S102	aa/ <u>aab</u> / ab
D9S132	bc/ ab/ ab	D20S48	bc/ bb/ ab	D1S205	cc/ <u>acc</u> / ab
D9S288	ac/ cc/ bc	D20S56	cc/ <u>bcb</u> / ab	D1S1609	ad/ <u>bdd</u> / bc
D9S286	ac/ ac/ bc	D20S59	ab/ ab/ ab	D1S1656	bc/ <u>abh</u> / ab
D9S156	bb/ bb/ ab	D20S66	bb/ bb/ ab		
D9S199	ac/ bc/ bb	D20S194	ab/ <u>acc</u> / cd		
D9S168	ab/ ab/ ab	D20S917	aa/ aa/ aa		
D9S269	bd/ <u>bcd</u> / ac	D20S27	ab/ <u>bcc</u> / cc		
D9S157	bb/ ab/ ac				
D9S162	bb/ bb/ ab				

M: Mother.

P: Patient.

F: Father

CASE 1

This case was born at term to a 40 years old mother and 39 years old father. Patient's birth weight was 3.6 kg. He was the fourth child born to unrelated parents. His one sister and two brothers died at 6, 10 and 2 months after delivery. He was evaluated at 8 months of age because of muscular hypotonia, mental retardation, abnormal EEG, defect of urea cycle, organic acidemia and seizures. His ultrasound screening did not reveal any abnormalities.

CASE 2

Amniocentesis was performed at 19 weeks of gestational age to a 30 years old pregnant woman referred for an increased serum screen risk of 1 : 264. Parents had a 7 years old, clinically normal son. Detailed ultrasound screening was performed but no fetal abnormality was detected. Parents decided to continue the pregnancy and a healthy girl was born at term.

Dicentric and bisatellited *de novo* marker chromosomes were observed in case 1 and 2. Their karyotypes were designated as 47, XY, + mar. Marker chromosomes were found to be derived from chromosome 15 by M-FISH analysis in both cases. These results were confirmed by FISH using WCP 15 probes. FISH studies with the SNRPN probe demonstrated the presence of one copy of the Prader-Willi/Angelman region on marker chromosome in case 1 whereas absence in case 2. Final karyotype of patient 1 was defined as 47, XY, +1qh+, +inv dup (15) (q12). Final karyotype of patient 2 was designated as 47, XY, +inv dup (15) (q11).

CASE 3

This case was a 39 years old man, in good health and of normal intelligence. Case ascertained because of infertility. Spermogram results were

found to be low (5-8 million/ml). Patient's parents were first degree consanguineous.

A monocentric and non-satellited, minute-like marker chromosome, approximately the size of chromosome 21 short arm, was observed in all of the patient's lymphocytes. His karyotype was 47, XY, + mar. Cytogenetic analysis could not be performed to the parents of the patient. M-FISH analysis showed that the marker chromosome was originated from chromosome 15. This result was confirmed by WCP 15 probe and patient's karyotype was designated as 47, XY, +der (15)(p11; q11).

CASE 4

This case was the first child of the second degree consanguineous parents. His mother and father were 22 and 28 years old respectively. His birth weight was 2.2 kg. He was evaluated at 8 months of age because of multiple congenital abnormalities including cleft palate, micrognathia, cardiac anomaly, dermatoglyphic anomaly, agenesis of corpus callosum, triangular face, large fontanel, hypoplasia of the cerebellum and coloboma of the iris. He died at the age of 9 months.

Karyotype of patient 4 was described as 46, XY, add (21)(p11). Cytogenetic analysis of his parents revealed that this rearrangement was not a translocation product. Analysis of the derivative chromosome by M-FISH revealed that the additional material originated from chromosome 1 (Fig. 1). This finding was confirmed by using WCP probes specific for chromosome 1. Final karyotype of the patient was designated as 46, XY, der (21)t(1;21)(q32;p11). Trisomic segment was found to be maternally in the origin. Observation of the two different alleles one of which is more intense from the other in microsatellite analysis indicated the postzygotic formation mechanism in this case.

CASE 5

This case was born at term to a 36 years old mother and 34 years old father. Her birth weight was 1800 g. She was referred to our hospital at the age of 8. Patient's parents suffered from infertility and they underwent IVF program. They got triplets by IVF, one of whom was our patient. She had mental motor retardation, small stature, microcephaly, down-slanting palpebral fissures, deep-set eyes, high flat nasal bridge, hypertelorism, globular nose, down-turned mouth, highly arched palate, low-set ears with dysplastic helixes, single palmar crease, clinodactyly, hypoplasia of nails and labia major hypoplasia (Fig. 2) (Table IV). Patient's sisters were clinically normal.

Additional material was observed on chromosome 8p of the patient's GTG banded metaphases. Her karyotype was designated as 46, XX, add (8p) (22). Parents' karyotypes were evaluated by GTG banding and found to be normal. M-FISH analysis showed that this region was originated



Figure 2:
Patient 5 at age 6.

Table IV:
Comparison of the clinical findings of case 5 with partial trisomy 9p and partial monosomy 8p syndromes.

Clinical Findings of Case 5	Partial trisomy 9p*	Partial monosomy 8p**
Mental-motor retardation	+	+
Low birth weight	-	+
Small stature	+	+
Behavioral problems	-	+
Microcephaly	+	+
Down-slanting palpebral fissures	+	-
Deep-set eyes	+	-
High flat nasal bridge	-	+
Hypertelorism	+	+
Globular nose	+	-
Down-turned mouth	+	-
Highly arched palate	-	+
Prominent low-set ears	+	+
Dysplastic helixes	-	+
Single palmar crease	+	-
Clinodactyly	-	-
Hypoplasia of nails	+	-
Labia major hypoplasia	-	+

* Based on data reported by Fujimoto *et al.* (16).

** Based on data reported by Hutchinson *et al.* (21) and Digilio *et al.* (12).

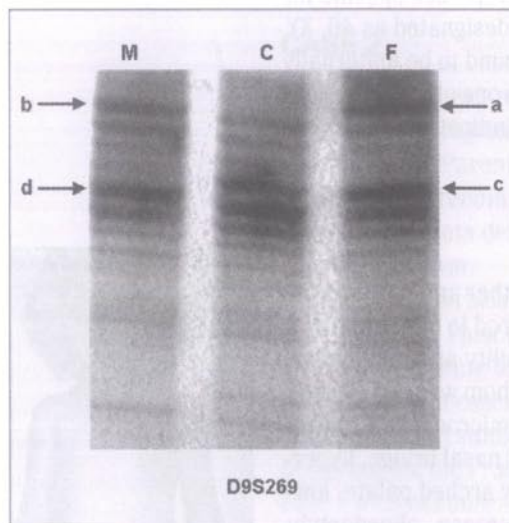


Figure 4: D9S269 microsatellite marker analysis results of patient 5. (M: Mother, C: Child, F: Father).

from chromosome 9 (Fig. 3). This finding was confirmed by using WCP probes specific for chromosome 9. According to M-FISH and FISH results, her final karyotype was defined as 46,XX,der(8)t(8;9)(p23; p22). This *de novo* derivative chromosome was maternal in the origin (Fig. 4). Observation of three different alleles, two maternal and one paternal, in microsatellite analysis indicated the prezygotic origin in this case.

CASE 6

Her mother and father were 21 and 23 years of age. Her birth weight was normal. This case was referred to our hospital at the age of five. She had multiple congenital anomalies including mental retardation, poor speech and motor coordination, developmental delay, coarse

and sparse hair, frontal bossing, round face, prominent occiput, large nasal bridge, hypertelorism, epicanthic folds, right nasal ductal canal stenosis with chronic dacryocystitis, pseudostrabismus, moderately large dysplastic ears, dental anomalies, short neck, clinodactyly, bila-

teral partial syndactyly of toes, pes planus, wide gap between first and second toes, partial dysgenesis of corpus callosum and cerebral atrophy (Fig. 5), (Table V).



Figure 5:
Patient 6 at age 5.

Clinical Findings of Case 6	Partial trisomy 20p*	Partial monosomy 18q**
Poor speech and motor coordination	+	-
Developmental delay	-	+
Psychomotor retardation	+	-
Coarse hair	+	-
Frontal bossing	-	-
Round face with prominent cheeks	+	-
Prominent occiput	-	-
Large nasal bridge	-	+
Hypertelorism	+	+
Epicanthic folds	+	+
Nasal ductal canal stenosis and dacryocystitis	-	-
Strabismus	+	+
Large dysplastic ears	+	+
Dental anomalies	+	-
Short neck	+	-
Clinodactyly	+	+
Bilateral partial syndactyly of toes	+	+
Pes planus	-	+
Gap between 1 th and 2 th toes	-	+
Partial dysgenesis of corpus callosum	-	+
Cerebral atrophy	-	+

* Based on data reported by Oppenheimer *et al.* (30) and Sidwell *et al.* (32).

** Based on data reported by Cody *et al.* (9), Silverman *et al.* (33) and Kline *et al.* (22).

Table V:
Comparison of the clinical findings of case 6 with the partial trisomy 20p and partial monosomy 18q syndromes.

Figure 1:
M-FISH karyotype of
patient 4 with
der(21)t(1;21)(q32;p11).

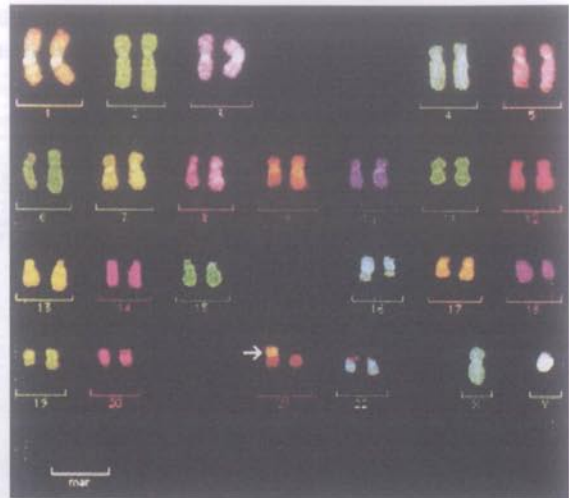


Figure 3:
M-FISH karyotype of
patient 5 with
der(8)t(8;9)(p23;p22).

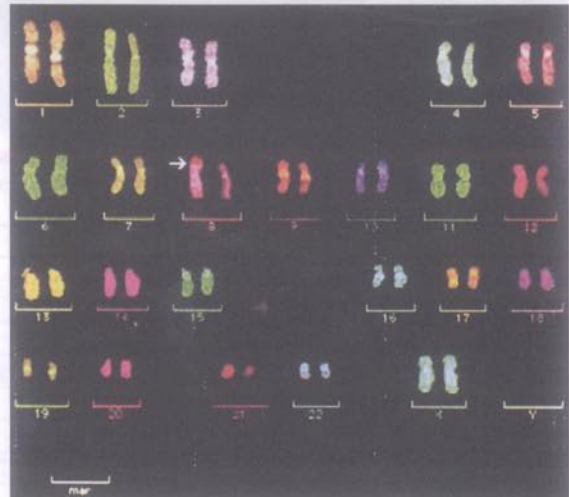
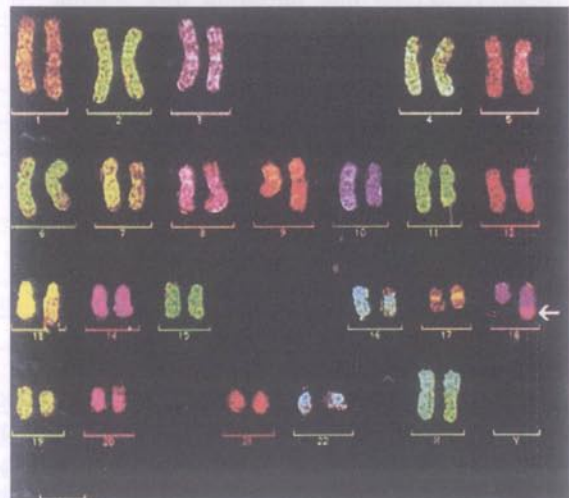


Figure 6:
M-FISH karyotype of
patient 6 with
der(18)t(18;20)(q32;p11.2).



Additional material was found on the long arm of chromosome 18 by GTG-banding. Parental karyotypes were evaluated by GTG banding and found normal. The origin of the additional material was detected as chromosome 20 by M-FISH (Fig. 6). This finding was confirmed by using WCP probe specific for chromosome 20. Her final karyotype was defined as 46, XX, der(18)t(18;20)(q32;p11.2). Parental origin of the derivative chromosome was paternal in this case.

DISCUSSION

Characterization of the marker and de novo derivative chromosomes is nearly impossible by conventional cytogenetic techniques. Introduction of molecular cytogenetic techniques (FISH studies) has allowed characterization of these chromosomal aberrations. Especially M-FISH allows karyotype-phenotype correlations via reflecting euchromatin content of marker chromosomes, because genetically inactive constitutive heterochromatin regions suppressed by unlabeled Cot-1 DNA probes in probe mix (23). The majority (80%) of the marker chromosomes was found to be derived from acrocentric chromosomes especially chromosomes 15 and 22 (18, 20). FISH studies have shown that half of them are derived from chromosome 15 and observed frequently as inv dup (15)(pter-q11-13::q11-13-pter) chromosomes (6, 10). In this study, marker chromosomes of the patients 1, 2 and 3 were found to be derived from chromosome 15.

Clinical findings of case 1, who had marker chromosome containing the PWS/AS locus were concordant with the inv dup (15) syndrome. Marker chromosome of the case 2 did not contain the PWS/AS locus but some euchromatin belonging to the proximal 15q. Half of the patients with such marker chromosomes, may have mental retardation (1, 4, 37). Genetic counseling was given to the family, and the family decided to continue the pregnancy. Clinical examination at 7 months of age showed no physical abnormality but it could not be determined that mental development is normal or not at this time.

Patient 3 had a nonsatellited, monocentric, chromosome 15 derived marker chromosome. This case was investigated because of infertility. There are several reports of male infertility associated with marker chromosomes derived from chromosome 15 (11, 25, 37). It has been proposed the reproductive failure in these cases could be the result of the elevated NOR activity, increase in constitutive heterochromatin or disturbing normal disjunction at meiosis (11, 17, 26). Taking into consideration the literature presented above, we can speculate that the marker chromosome observed in this case may be the cause of infertility.

Patient 4 had partial trisomy 1 (q32-qter). To date only 8 cases with pure partial trisomy 1q32-qter have been published (7, 8, 13, 15, 24, 34). To our knowledge, this is the first report of nearly pure partial trisomy

1(q32-qter) due to de novo unbalanced translocation. Clinical findings of this patient which were consistent with clinical findings observed in other partial trisomy 1q32 cases were: low birth weight, agenesis of corpus callosum, cleft palate, large anterior fontanel, prominent forehead, ocular anomalies, micrognathia, simian creases, congenital heart disease, perinatal death, developmental delay and growth retardation (29).

In this study patient 5 had trisomy 9 (p22-pter) and monosomy 8(p23-pter). Her clinical findings composed of clinical findings of partial trisomy 9p and partial monosomy 8p (12, 16, 21). Ausems *et al.*, have reported a patient with partial trisomy 9p and concomitant partial monosomy 8p (3). Both their case and our case had phenotypes compatible with the partial trisomy 9p syndrome. In addition, both of the cases had genitourinary abnormalities and high arched palate which are characteristic features of 8p terminal deletions. The phenotype of our case suggests that partial deletion of 8p has a minor effect on phenotype in patients with partial trisomy 9p. Tsezou *et al.*, have reported that there was no difference between clinical findings of a maternal and a paternal 9p trisomy cases (36). As a result, size and parental origins of the trisomic segment and small deletions of other chromosomes have minor or no effects on clinical findings of trisomy 9p syndrome patients.

Patient 6 had trisomy 20(p11.2-pter) and monosomy 18(q32-qter). Her clinical picture was composed of clinical findings of partial trisomy 20p and partial monosomy 18q (9, 22, 30, 32, 33). Most of the clinical findings of this case belongs to trisomy 20p syndrome. It may be associated with large duplicated material versus small monosomy 18q segment or other factors cause of not all patients with this deletion had the clinical findings (35). In our case partial dysgenesis of corpus callosum, cerebral atrophy, large nasal bridge, gap between 1th and 2nd toes and pes planus were attributable to monosomy 18(q32-qter). Previous studies have suggested that the existence of the gene/genes can be responsible for the development of the brain structures in distal 18q (22). Agenesis of the corpus callosum is one of the clinical findings of distal 18q deletion (5, 38). Prominent occiput, frontal bossing, nasal ductal canal stenosis and dacriocystitis traits are not the main clinical findings of either trisomy 20p or monosomy 18q and may be the consequence of the coexistence of this alterations together. To our knowledge this is the first report of a patient with trisomy 20 (p11.2-pter) and monosomy 18 (q32-qter) simultaneously. Also there is no report about the effect of the parental origin of partial trisomy 20p on phenotypic variations observed in partial trisomy 20p cases.

As a result, M-FISH is an important technique allowing the characterization of marker and derivative chromosomes rapidly and accurately. Identification of marker and derivative chromosomes using M-FISH resulted in a better karyotype-phenotype correlation, to overcome genetic counseling problems faced in clinical genetics and to detect new partial trisomy and/or partial monosomy syndromes and disease related genes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study, a part of which was presented as Masters thesis to Akdeniz University, Institute of Health Sciences, was supported by Akdeniz University Scientific Research Project Management Unit, with project no 20.02.0122.07. The authors thank Albert Schinzel for expert technical assistance in parental origin studies.

REFERENCES

1. ABUELO D., MARK H.F., BIER J.: Developmental delay caused by a supernumerary chromosome, inv dup (15), identified by fluorescent in situ hybridization. *Clin. Pediatr. (Phila)*, 1995, 34 (4), 223-226.
2. ANDERLID B.M., SAHLÉN S., SCHOUmans J., HOLMBERG E., ÅHSGREN I., MORTIER G., SPELEMAN F., BLENNOW E.: Detailed characterization of 12 supernumerary ring chromosomes using micro-FISH and search for uniparental disomy. *Am. J. Med. Genet.*, 2001, 99 (3), 223-233.
3. AUSEMS M.G., VAN SPIJKER H.G., DIJKHUIS H.J., SWANENBURG DE VEYE H.F., BIJLSMA J.B.: Follow-up of a patient with partial monosomy 8p: Description of physical and psychosocial development. *Genet. Couns.*, 1996, 7 (1), 61-65.
4. BATTAGLIA A., GURRIERI F., BERTINI E., BELLACOSA A., POMPONI M.G., PARAVATOU-PETSOTAS M., MAZZA S., NERI G.: The inv dup (15) syndrome: A clinically recognizable syndrome with altered behavior, mental retardation, and epilepsy. *Neurology*, 1997, 48 (4), 1081-1086.
5. BEKIESINSKA-FIGATOWSKA M., WALECKI J.: MRI of the hypophysis in a patient with the 18q- syndrome. *Neuroradiology*, 2001, 43 (10), 875-876.
6. BLENNOW E., TELENUS H., DE VOS D., LARSSON C., HENRIKSSON P., JOHANSSON Ö., CARTER N.P., NORDENSKJÖLD M.: Tetrasomy 15q: Two supernumerary marker chromosomes with no detectable alpha-satellite DNA. *Am. J. Hum. Genet.*, 1994, 54 (5), 877-883.
7. BROADWAY D.C., LYONS C.J., MC GILLIVRAY B.C.: Anterior segment dysgenesis and congenital glaucoma associated with partial trisomy of chromosome 1 (1q32-qter). *J. AAPOS.*, 1998, 2 (3), 188-190.
8. CLARK B.J., LOWTHER G.W., LEE W.R.: Congenital ocular defects associated with an abnormality of the human chromosome 1: trisomy 1q32-qter. *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus*, 1994, 31 (1), 41-45.
9. CODY J.D., GHIDONI P.D., DUPONT B.R., HALE DE, HILSENBECK S.G., STRATTON R.F., HOFFMAN D.S., MULLER S., SCHAUB R.L., LEACH R.J., KAYE C.I.: Congenital anomalies and anthropometry of 42 individuals with deletions of chromosome 18q. *Am. J. Med. Genet.*, 1999, 85 (5), 455-462.
10. COTTER P.D., LEDESMA C.T., DIETZ L.G., PUSSO S., WOHLFERD M.M., GOLDBERG J.D.: Prenatal diagnosis of supernumerary marker 15 chromosomes and exclusion of uniparental disomy for chromosome 15. *Prenat. Diagn.*, 1999, 19 (8), 721-726.
11. CROLLA J.A., HARVEY J.F., SITCH F.L., DENNIS N.R.: Supernumerary marker 15 chromosomes: a clinical, molecular and FISH approach to diagnosis and prognosis. *Hum. Genet.*, 1995, 95 (2), 161-170.
12. DIGILIO M.C., MARINO B., GUCCIONE P., GIANNOTTI A., MINGARELLI R., DALLAPICCOLA B.: Deletion 8p syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, 1998, 75 (5), 534-536.
13. DUBA H.C., ERDEL M., LÖFFLER J., BEREUTHER L., FISCHER H., UTERMANN B., UTERMANN G.: Detection of a de novo duplication of 1q32-qter by fluorescence in situ hybridisation in a boy with multiple malformations: further delineation of the trisomy 1q syndrome. *J. Med. Genet.*, 1997, 34 (4), 309-313.
14. EILS R., UHRIG S., SARACOĞLU K., SÄTZLER K., BOLZER A., PETERSEN I., CHASSERY J., GANSER M., SPEICHER M.R.: An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH). *Cytogenet. Cell. Genet.*, 1998, 82 (3-4), 160-171.
15. FLATZ S., FONATSCH C.: Partial trisomy 1q due to tandem duplication. *Clin. Genet.*, 1979, 15 (6), 541-542.
16. FUJIMOTO A., LIN M.S., SCHWARTZ S.: Direct duplication of 9p22-24 in a child with duplication 9p syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, 1998, 77 (4), 268-271.
17. GENTILE M., SUSCA F., RESTA N., STELLA A., CASCONA A., GUANTI G.: Infertility in carriers of two bisatellited marker chromosomes. *Clin. Genet.*, 1993, 44 (2), 71-75.

18. GRAVHOLT C.H., FRIEDRICH U.: Molecular cytogenetic study of supernumerary marker chromosomes in an unselected group of children. *Am. J. Med. Genet.*, 1995, 56 (1), 106-111.
19. HADDAD B.R., SCHROCK E., MECK J., COWAN J., YOUNG H., FERGUSON-SMITH M.A., DU MANOIR S., RIED T.: Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. *Hum. Genet.*, 1998, 103 (5), 619-625.
20. HASTINGS R.J., NISBET D.L., WATERS K., SPENCER T., CHITTY L.S.: Prenatal detection of extra structurally abnormal chromosomes (ESACs): New cases and a review of the literature. *Prenat. Diagn.*, 1999, 19 (5), 436-445.
21. HUTCHINSON R., WILSON M., VOULLAIRE L.: Distal 8p deletion (8p23.1-8pter): a common deletion? *J. Med. Genet.*, 1992, 29 (6), 407-411.
22. KLINE A.D., WHITE M.E., WAPNER R., ROJAS K., BIESECKER L.G., KAMHOLZ J., ZACKAI E.H., MUENKE M., SCOTT C.I., OVERHAUSER J.: Molecular analysis of the 18q- syndrome- and correlation with phenotype. *Am. J. Hum. Genet.*, 1993, 52 (5), 895-906.
23. LANGER S., FAUTH C., ROCCHI M., MURKEN J., SPEICHER M.R.: AcroM fluorescent in situ hybridization analyses of marker chromosomes. *Hum. Genet.*, 2001, 109 (2), 152-158.
24. LE GOFF L., HADJADJ E., DENIS D.: Ocular defects associated with a duplication of the distal part of the long arm of chromosome 1: a case report. *J. Fr. Ophthalmol.*, 2002, 25 (4), 388-392.
25. MANENTI E.: Two extra inv dup (15) chromosomes and male infertility: second case. *Am. J. Med. Genet.*, 1992, 42 (3), 402-403.
26. MARTIN-LUCAS M.A., PEREZ-CASTILLO A., ABRISQUETA J.A.: Infertility associated with two accessory bisatellited chromosomes. *Hum. Genet.*, 1986, 73 (2), 133-136.
27. MILLER S.A., DYKES D.D., POLESKY H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16 (3), 1215.
28. NIETZEL A., ROCCHI M., STARKE H., HELLER A., FIEDLER W., WLODARSKA I., LONCAREVIC I.F., BEENSEN V., CLAUSSEN U., LIEHR T.: A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum. Genet.*, 2001, 108 (3), 199-204.
29. NUÑO-ARANA I., GONZALES-GARCIA J.R., GARCIA-CRUZ D.: Further clinical delineation in trisomy 1q32 syndrome. *Ann. Génét.*, 2001, 44 (4), 175-177.
30. OPPENHEIMER S., DIGNAN P., SOUKUP S.: Partial trisomy 20p: Familial occurrence. *Am. J. Med. Genet.*, 2000, 95 (4), 316-319.
31. PERGAMENTE E.: New molecular techniques for chromosome analysis. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Obstet. and Gynaecol.*, 2000, 14 (4), 677-690.
32. SIDWELL R.U., PINSON M-P., GIBBONS B., BYATT S-A., SVENNEVIK E.C., HASTINGS R.J., FLYNN D.M.: Pure trisomy 20p resulting from isochromosome formation and whole arm translocation. *J. Med. Genet.*, 2000, 37, 454-458.
33. SILVERMAN G.A., SCHNEIDER S.S., MASSA H.F., FLINT A., LALANDE M., LEONARD J.C., OVERHAUSER J., VAN DEN ENGH G., TRASK B.J.: The 18q-syndrome: Analysis of chromosomes by bivariate flow karyotyping and the PCR reveals a successive set of deletion breakpoints within 18q21.2-22.2. *Am. J. Hum. Genet.*, 1995, 56 (4), 926-937.
34. STEFFENSEN D.M., CHU E.H.Y., SPEERT D.P., WALL P.M., MEILINGER K., KELCH R.P.: Partial trisomy of the long arm of human chromosome 1 as demonstrated by in situ hybridization with 5S ribosomal RNA. *Hum. Genet.*, 1977, 36 (1), 25-33.
35. STRATHDEE G., SUTHERLAND R., JONSSON J.J., SATALOFF R., KOHONEN-CORISH M., GRADY D., OVERHAUSER J.: Molecular characterization of patients with 18q23 deletions. *Am. J. Hum. Genet.*, 1997, 60 (4), 860-868.
36. TSEZOU A., KITSIOU S., GALLA A., PETERSEN M.B., KARADIMA G., SYRROU M., SAHLEN S., BLENNOW E.: Molecular cytogenetic characterization and origin of two de novo duplication 9p cases. *Am. J. Med. Genet.*, 2000, 91 (2), 102-106.
37. WEBB T.: Inv dup (15) supernumerary marker chromosomes. *J. Med. Genet.*, 1994, 31 (8), 585-594.
38. ZANNOLLI R., PIERLUIGI M., PUCCI L., LAGRASTA N., GASPARRE O., MATERA M.R., DI BARTOLO R.M., MAZZEI M.A., SACCO P., MIRACCO C., DE SANTI M.M., AITIANI P., CAVANI S., PELLEGRINI L., FIMIANI M., ALESSANDRINI C., GALLUZZI P., LIVI W., GONNELLI S., TERROSS-VAGNOLI P., ZAPPELLA M., MORGESE G.: 18q-syndrome and ectodermal dysplasia syndrome: description of a child and his family. *Am. J. Med. Genet.*, 2003, 116A (2), 192-199.

ADRESA FOR CORRESPONDENCE:

Sibel Berker Karauzum
Akdeniz University, Faculty of Medicine
Department of Medical Biology and Genetics
TR-07070 Antalya, Turkey
Tel: 90-242-2274343/44359
Fax: 90-242-2274482
E-mail: sibelkarauzum@akdeniz.edu.tr

NOVEL CYTOGENETIC FINDINGS REVEALED BY CONVENTIONAL CYTOGENETIC AND FISH ANALYSES IN LEUKAEMIA PATIENTS

S.B. Karauzum^{1*}, T. Bilgen¹, I. Karadogan², S. Yakut¹, Z. Cetin¹, A. Ugur², G. Luleci¹

¹Department of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, Turkey

²Department of Internal Medicine and Haematology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, Turkey

Aim: To describe novel cytogenetic findings in four leukaemia patients. **Methods:** Conventional cytogenetic (CC) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analyses were performed on bone marrow samples of four leukaemia patients. **Results:** In this study, t(3;10)(q11;q25) and t(2;22)(p21;q11.2) were detected as novel translocations. t(8;16;21)(q22.1;q13;q22) and t(1;6;9;22)(p36.1;p21.3;q34;q11) were found as variant translocations, and these variant translocations were confirmed by Interphase-FISH and Multicolour-FISH. **Conclusion:** Newly identified cytogenetic findings can lead us to characterize cytogenetic evolution of the haematological malignancies. Further investigations are certainly warranted to resolve the prognostic impact of these new cytogenetic abnormalities.

Key Words: haematological malignancies, conventional cytogenetics, FISH, new chromosomal abnormalities.

Conventional cytogenetics (CC) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques are widely used for detection of cytogenetic anomalies, which play an important role in diagnosis of malignant haematological diseases, and are independent predictors of disease progression and survival [1]. Many chromosomal abnormalities, especially translocations and inversions have been commonly shown to result in formation of fusion genes with transforming effects, are closely associated with a particular subtype of leukaemia [2, 3]. Also rare chromosomal rearrangements have been continually discovered in some patients leading to identification of new genetic changes associated with diagnosis, classification, prognosis and treatment of leukaemia [4].

Chromosome 3q rearrangements have been described in approximately 2% of patients with acute myeloid leukemia, and are generally associated with poor prognosis [5]. Also variant forms of the known and subtype specific translocation have been still described in myeloid malignancies. The complex variant of t(8;21) and variants of the t(9;22) occur in approximately 3% and 5-8% of cases with related disease, respectively [6, 7]. It is also suggested that these simple or complex variant translocations can be associated with prognosis of leukaemia [8].

In this study, we present novel cytogenetic findings using CC and FISH, and discuss their potential effect on diagnosis and prognosis of leukaemia.

MATERIALS AND METHODS

Patients. We studied bone marrow cells of 141 patients from Departments of Pediatric and Adult Haematology/Oncology, Faculty of Medicine in Akdeniz University during four years. Written informed consent was obtained from all patients before entry into the study. Of these patients, CC, molecular cytogenetic

and clinical data of four cases that were found to have new cytogenetic findings are presented here.

Conventional karyotyping. Bone marrow cells were harvested according to standard protocol [9]. 20 GTG banded bone marrow metaphases were analyzed from each case whenever possible.

FISH studies. FISH study was performed using directly fluorochrome labeled probes; *BCR-ABL* (Vysis) for t(9;22)(q34;q11.2), *PML-RAR* (CytoCell) for t(15;17)(q22;q11), *AML1-ETO* (CytoCell) for t(8;21)(q22;q22), *CBFB-MYH11* (CytoCell) for inv(16)(p13;q22). For each patient, minimum 200 interphase cells were analyzed using fluorescent microscope and fusion signals of 5% or less were assumed as false positive according to our lab's cut-off value. Whole chromosome painting probes (chromosomes 4 and 11) (CytoCell) were used for t(4;11). To identify the complex karyotypes of two cases, M-FISH (Vysis) was applied.

RESULTS AND DISCUSSION

Three AML and one CML patients were found to have newly described cytogenetic findings. Cytogenetic, molecular cytogenetic and clinical outcomes of the patients are given in a Table.

Case 1. When the patient (case 1) was diagnosed as AML-M2 in March 2003, *AML1-ETO* fusion gene resulting from t(8;21) was detected by FISH (Fig. 1, a) and also a rearrangement including chromosome 8, 16, 21 and loss of Y were detected in the cytogenetic analysis (Fig. 1, b). To determine the karyotype, we performed M-FISH and the karyotype of the patient was found to be 45,X,-Y,t(8;16;21)(q22.1;q13;q22.1) [9] / 46,X,t(8;16;21)(q22.1;q13;q22.1) [13]. In carrying t(8;21) interphase cell nuclei, two fused signals were expected in addition to normal 8 and 21 alleles. Whereas, only one fused signal was detected in addition to normal green and red signals due to the variant translocation of t(8;21) in this patient (see Fig. 1, a). In March 2003, remission was achieved by 7+3 standard therapy. Two courses of intermediate-dose Ara-C (IDAC) was administered as consolidation therapy in April 2003. Relapse occurred in December 2003. The patient died in a month. The patients with t(8;21) appear to have a favorable prognosis [10]. Variant translocations of t(8;21)(q22;q22) have been reported including chromo-

Received: June 2, 2005.

*Correspondence: Fax: +90 (242) 227 4482

E-mail: sibelkaruzum@akdeniz.edu.tr

Abbreviations used: CC - conventional cytogenetics; FISH - fluorescence *in situ* hybridization.

Table. Patient's characteristics

Case No	Age/ Sex	Diagnosis	FISH Results	Conventional cytogenetic results	Treatment	Survival period	Clinical outcome
1	68/M	AML-M2	t(8;21)(+)	45,X,-Y,(8;16;21)(q22.1;q13;q22)[9]/ 46,XY,(8;16;21)(q22.1;q13;q22)[13]	7 + 3 ST, IDAC,	March 2003 – December 2003	Died
2	53/M	AML-M4	t(9;22)(-)	46,XY,t(2;22)(p21;q11.2)[9]/ 46,XY[3]	7 + 3 ST, HIDAC, FLAG-IDA, EMA	June 2002 – March 2004	Died
3	37/F	AML-M5	t(9;22)(-)	46,XX,t(3;10)(q21;q25)[8]/ 46,XX[7]	7 + 3 ST, FLAG, HIDAC	November 2001 – July 2002	Unknown
4	63/M	CML	t(9;22)(+)	46,XY,t(1;6;9;22)(p36.1;p21.3;q34;q11)[10]/ 46,XY[10]	IFN, Glivec	December 2000	Chronic phase CML

Notes: 7 + 3 ST – standard dose Cytarabine + Daunorubicine; HIDAC – high dose Cytarabine; IDAC – intermediate dose Cytarabine; EMA – Etoposide-mitoxantrone-cytarabine; FLAG – Fludarabine-cytarabine-granulocyte colony stimulating factor; IFN – interferon.

some regions 4q35, 5q31, 6q21, 10p15, 12q13, 12q24, 13q12, 14q24, 15q21, 17q23, 18q23 and 20q13 [11]. In this study, to our knowledge, we described a new variant including 16q13. Loss of Y has been observed as a secondary change in particular AML-M2 patients with t(8;21). It has been reported that the loss of Y chromosome can be neutral and related to the age [12, 13]. In a previous study, loss of Y was observed in all cells carrying variant t(8;21;14) and two courses of remission induction therapy with Ara-C + Idarubicin failed. Complete remission was achieved by the subsequent HIDAC administration [11]. Similarly, in our patient, detected loss of chromosome Y in 9 of 22 metaphases carrying t(8;16;21), remission induction therapy failed. Remission was achieved by subsequent HIDAC administration but the patient died because of the early relapse after eight months. The presence of loss of Y in 9 of 22 metaphases in our patient supports the loss of Y that can be one of the secondary event. We also have two other AML-M2 patients who have t(8;21) and loss of Y. Although one of them received repetitive induction chemotherapies using 7 + 3 and HIDAC + mitoxantrone, he couldn't achieve remission. Three weeks after the last therapy the patient died due to intracranial bleeding. In the other case, remission was achieved by 7 + 3 induction and HIDAC + mitoxantrone reinduction chemotherapies. The patient is being still followed receiving HIDAC + mitoxantrone and HIDAC consolidation chemotherapies. Failure of remission with standard therapy, early relapse and prolonged aplasia period in our case, who has variant t(8;21), can be explained by presence of the variant translocation and/or loss of Y. If poor response to therapy is considered in these three patients, loss of Y can be have clinical importance. However, the impact on prognosis and response to therapy of Y chromosome loss and variant translocations remains uncertain.



Fig. 1, a. FISH analysis of AML-M2 patient with t(8;16;21)(q22.1;q13;q22.1). Only one fused signal was detected in addition to normal 8 and 21 alleles due to the variant translocation of t(8;21) in this patient. Green, red and yellow signals indicate AML1, ETO genes and t(8;21) respectively

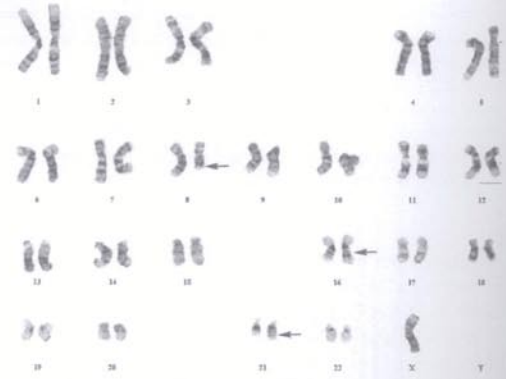


Fig. 1, b. Karyotype of AML-M2 patient with t(8;16;21)(q22.1;q13;q22.1). Arrows indicate breakpoints (Case 1)

Case 2. In June 2002, the patient was diagnosed as AML-M4. Since he also has splenomegaly and basophilia, t(9;22) was tested by FISH to exclude CML. FISH result was negative. The patient received 7 + 3 remission induction chemotherapy in June 2002. Two weeks after the first therapy, 7 + 3 standard therapy was restarted due to the first induction failure. Remission was achieved with reinduction. Cytogenetic examination of bone marrow on July 1, 2002 revealed t(2;22)(p21;q11.2) (Fig. 2). Consolidation chemotherapy using HIDAC was administered four times in August, October, November 2002 and in January 2003. When relapse occurred on March 25, 2003, in addition to t(2;22), monosomy 7 was observed in the cytogenetic study of bone marrow. Although fludarabine-cytarabine-granulocyte colony-stimulating factor (FLAG)-IDA therapy was given, the patient did not achieve remission. Even remission was achieved by EMA chemotherapy, the patient died in March 2004 due to the prolonged aplasia. In our case, poor prognosis was consistent with the report that the presence of monosomy 7 may result in a worse response to induction chemotherapy in AML patients [14]. Furthermore, we report a novel translocation between chromosome 2 and 22 including these breakpoints. In most of previous studies, 2p21 has been reported as a partner breakpoint of 11q23. On the other hand, 2p21 involved in different breakpoints of chromosome 3 including q26, q27 and q29, have been reported in one AML, one primary myelofibrosis and one RAEB (refractory anemia with excess of blasts) case [15]. Although the gene involved in 2p21 is unknown, there might be an oncogene either in 2p21 or 22q11.2 region in order to form fusion gene. The other possibility is that the appearance of this rearrangement may be resulting from a genomic instability without oncogenic activity of these regions. Poor prognosis in our

case might be explained by monosomy 7 or presence of $t(2;22)(p21;q11.2)$.

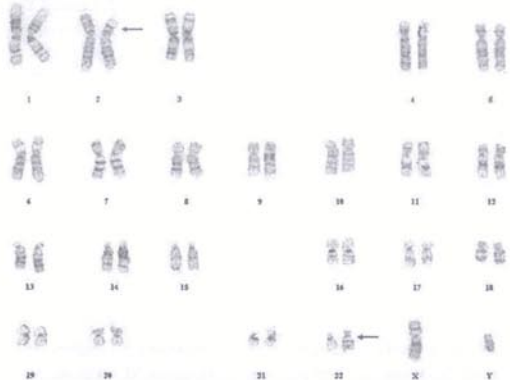


Fig. 2. Karyotype of AML M4 patient with $t(2;22)(p21;q11.2)$. Arrows indicate breakpoints (Case 2)

Case 3. $t(3;10)(q21;q25)$ was detected in the cytogenetic study in this patient who had been diagnosed as AML-M5 in November 2001 (Fig. 3). The remission was hardly achieved using the courses of 7+3 and FLAG as remission induction chemotherapies. Because of the neutrophilia observed after the first remission, to exclude CML blastic transformation $t(9;22)$ was tested by FISH technique. The FISH result was found negative. $t(3;10)$ was detected again in bone marrow by CC. Consolidation therapy using HIDAC was given for three times in March, May and July 2002, but patient relapsed after six months. Although various chromosomal abnormalities have been described in AML-M5, $t(3;10)(q21;q25)$ has never been described before. However, involving 3q21 and 10q25 breakpoint regions have been reported in leukaemia with different partner genes. Two genes which have been described in the 3q21 region are associated with oncogenic activity. *RPN1* and *GR6* genes, located in 3q21 region, might play a partner role in fusion gene with oncogenic activity [16]. The possible role of 10q25 in leukaemia is unknown. It might be speculated that possible proto-oncogene in 10q25 could be activated by a partner gene in 3q21 such as *RPN1* gene. In our case, since remission was hardly achieved and relapse occurred, this rearrangement may be related with unfavorable prognosis.

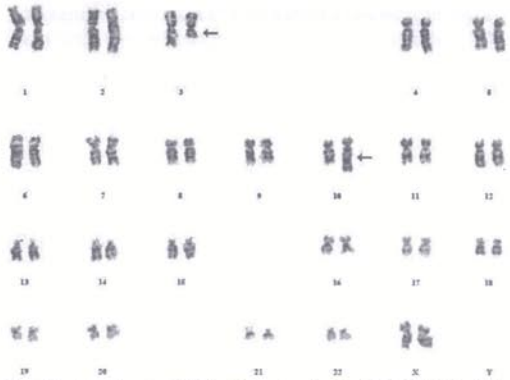


Fig. 3. Karyotype of AML M5 patient with $t(3;10)(q21;q25)$. Arrows indicate breakpoints (Case 3)

Case 4. The patient was diagnosed to have CML in December 2000 and α -IFN and subsequently Glivec were administered. $t(9;22)$ was observed by FISH in August 2003. However; in the cytogenetic analysis, unexpected band patterns were detected on the end of q arm of chromosome 9 and chromosome 6p (Fig. 4). To find out the origins of the extra bands on der(9) and der(6), we performed M-FISH and the karyotype of the patient was designed as $t(1;6;9;22)(p36.1;p21.3;q34;q11)$. Variant forms of Ph translocations are seen in 5–10% of CML cases, including simple and complex variant translocations [10]. Although it is generally believed that complex Ph translocations have no importance on disease prognosis, it is not elucidated clearly. Deletions of the flanking region the $t(9;22)$ breakpoints in CML are associated with poorer survival. The deletions occur with a higher frequency in patients with variant Ph translocations than in those with classic Ph [17]. Therefore; detection of variant Ph translocation can be important for disease management. Complex three-way Ph translocations involving chromosome 1p36.1 and 6p21 have been described before; see <http://cgap.nci.nih.gov/chromosome/Mitelman-Search> Accessed October 3, 2004 [18, 19]. However; we described a new translocation $t(1;6;9;22)(p36.1;p21.3;q34;q11)$ as a variant of the $t(9;22)$. The case is still being followed as chronic phase CML in spite of the Glivec use, and this situation can be related to the complex variant translocation detected in the patient.

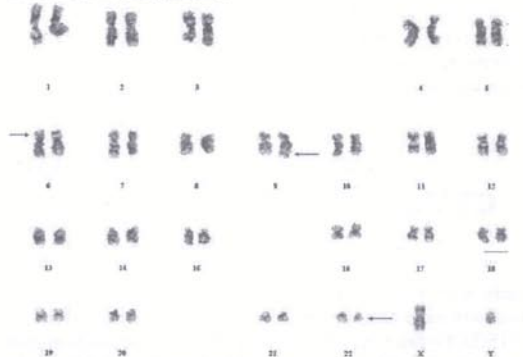


Fig. 4. Karyotype of CML patient with $t(1;6;9;22)(p36.1;p21.3;q34;q11)$. Arrows indicate breakpoints (Case 4)

Conclusion. Newly described chromosomal abnormalities were correlated with clinical course of the patients, and the significance of the cytogenetic findings was emphasized once again in this study. Obviously, accumulation of data on new chromosomal abnormalities would provide the understanding of their molecular mechanism and their impact on prognosis and treatment of leukaemia.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Akdeniz University Scientific Research Project Management Unit.

REFERENCES

1. Kasakyan S, Tachdjian G, Movsessyan E, Dagbhashyan S, Muradyan L, Aboura A, Hovannissyan A, Muradyan A,

- Mkrtchyan H, Arutyunian R. Application of FISH technique for cytogenetic analysis in chronic myeloid leukemia patients. *Exp Oncol* 2003; 25: 74–6.
2. Rowley JD. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Ann Rev Genet* 1998; 32: 495–519.
3. Sozzi G, Testi MA, Croce CM. Advances in cancer cytogenetics. *J Cell Biochem* 1999; 32–33: 173–82.
4. Lungeanu A, Arghir A, Lupu A, Mut Popescu D. Relationship between chromosomal changes complexity and disease aggressiveness in myeloid and lymphoid disorders. *J Cell Mol Med* 2002; 6: 389–98.
5. Charrin C, Belhabri A, Treille-Ritouet D, Theuil G, Magaud JP, Fiere D, Thomas X. Structural rearrangements of chromosome 3 in 57 patients with acute myeloid leukemia: clinical, hematological and cytogenetic features. *Hematol J* 2002; 3: 21–31.
6. Xue Y, Niu C, Chen S, Wang Y, Guo Y, Cie X, et al. Two cases of AML(M2) with a t(8;19)(q22;q13): a new cytogenetic variant. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 118: 154–8.
7. Sessarego M, Fugazza G, Bruzzone R, Ballestrero A, Miglino M, Bacigalupo A. Complex chromosome rearrangements may locate the bcr/abl fusion gene sites other than 22q11. *Haematologica* 2000; 85: 35–9.
8. Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha M, Telford N, Chang J, Reid A, Bench A, Champion K, Huntly B, Green AR. Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95: 738–44.
9. Rooney DE, Czepulkowski BH. Human cytogenetics: malignancy and acquired abnormalities. A practical approach, vol 2. New York: Oxford University Press, 1992.
10. Chen Z, Sandberg AA. Molecular cytogenetic aspects of hematological malignancies: clinical implications. *Am J Med Genet* 2002; 115: 130–41.
11. Ishida F, Ueno M, Tanaka H, Makishima H, Suzawa K, Hosaka S, Hidaka E, Ishikawa M, Yamauchi K, Kitano K, Kiyosawa K. t(8;21;14)(q22;q22;q24) is a novel variant of t(8;21) with chimeric transcripts of AML1-ETO in acute myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 132: 133–5.
12. Abeliovich D, Yehuda O, Ben-Neriah S, Or R. Loss of Y chromosome. An age-related event or a cytogenetic marker of a malignant clone? *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 76: 70–1.
13. Wiktor A, Rybicki BA, Piao ZS, Shurafa M, Barthel B, Maeda K, Van Dyke DL. Clinical significance of Y chromosome loss in hematologic disease. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27: 11–6.
14. Brozek I, Babinska M, Kardas I, Wozniak A, Balcerska A, Hellmann A, Limon J. Cytogenetic analysis and clinical significance of chromosome 7 aberrations in acute leukaemia. *J Appl Genet* 2003; 44: 401–12.
15. Sancho JM, Ribera JM, Granada I, Navarro JT, Milla F, Feliu E. Myelofibrosis in myeloid malignancies with 3q26 cytogenetic abnormalities. *Haematologica* 2000; 85: 554–5.
16. Martinelli G, Ottaviani E, Buonamici S, Isidori A, Borsaru G, Visani G, Piccaluga PP, Malagola M, Testoni N, Rondoni M, Nucifora G, Tura S, Baccarani M. Association of 3q21q26 syndrome with different RPN1/EVI1 fusion transcripts. *Haematologica* 2003; 88: 1221–8.
17. Reid A, Gribble SM, Huntly BJ, Andrews KM, Campbell L, Grace CD, Wood ME, Green AR, Nacheva EP. Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukaemia can mimic typical blast crisis chromosome abnormalities or classic t(9;22): a report of two cases. *Br J Haematol* 2001; 113: 439–42.
18. Lau LC, Knight L, Tien SL, Lim P, Yong MH, Chong YY. Highly complex chromosomal rearrangement of chromosome 9 in a case of chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 104: 153–6.
19. Mori N, Morosetti R, Spira S, Lee S, Ben-Yehuda D, Schiller G, Landolfi R, Mizoguchi H, Koeffler HP. Chromosome band 1p36 contains a putative tumor suppressor gene important in the evolution of chronic myelocytic leukemia. *Blood* 1998; 92: 3405–9.

НОВЫЕ ДАННЫЕ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДАМИ СТАНДАРТНОГО ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО И FISH-АНАЛИЗА У БОЛЬНЫХ ЛЕЙКЕМИЕЙ

Цель: представить новые цитогенетические данные у четырех больных лейкозами. **Методы:** для исследования образцов костного мозга были применены стандартный цитогенетический (ЦГ) анализ и метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). **Результаты:** в данном исследовании были выявлены новые транслокации t(3;10)(q11;q25) и t(2;22)(p21;q11.2). Транслокации t(8;16;21)(q22.1;q13;q22) и t(1;6;9;22)(p36.1;p21.3;q34;q11) были идентифицированы как варианты и подтверждены методами Interphase-FISH и Multicolour-FISH. **Выводы:** полученные цитогенетические данные позволяют охарактеризовать цитогенетическую эволюцию онкогематологических заболеваний. Для оценки прогностического значения описанных цитогенетических аномалий необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: гематологические заболевания, стандартная цитогенетика, FISH, новые хромосомные аномалии.

Donor Cell-derived Acute Myeloblastic Leukemia After Allogeneic Peripheral Blood Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Juvenile Myelomonocytic Leukemia

Zafer Cetin, MSc,*† Gulsun Tezcan, MD,*† Sibel Berker Karauzum, PhD,*†
Alphan Kupesiz, MD,*† Ayse Esra Manguoglu, PhD,*† Akif Yesilipek, MD,*†
Guven Luleci, PhD,*† and Volkan Hazar, MD*†

Summary: Despite its rarity, donor cell leukemia (DCL) is a most intriguing entity. We report here the case of a 5-year-old girl with juvenile myelomonocytic leukemia and normal female karyotype who developed acute myeloblastic leukemia with a karyotype of 46, X, t(X; 7) (p21; p11.2), der(7) t(3; 7) (q13.3; q22) 5 months after peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation from her HLA-matched sister. We performed the analysis of short tandem repeat sequence markers to DNA obtained from donor peripheral blood, patient's peripheral blood including leukemic blasts and patient's hair root. This analysis showed that the leukemic blood DNA matched the donor blood DNA and not the patient's DNA, thus confirming DCL. To our knowledge, this is the first case of DCL after peripheral blood SCT for juvenile myelomonocytic leukemia.

Key Words: JMML, donor cell leukemia, stem cell transplantation

(*J Pediatr Hematol Oncol* 2006;28:763–767)

The recurrence of leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is one of the major consequences of treatment failure. It frequently results from outgrowth of residual host tumor cells; however, in a minority of cases, it may originate from donor cells. Donor cell leukemia (DCL) accounted for approximately 5% of relapses as demonstrated by cytogenetic studies of 54 relapses in sex-mismatched bone marrow transplants.¹ Until molecular engraftment studies became available in the mid 1980s, it may be considered that the number of cases was actually underestimated because of the lack of adequate diagnostic tools for documentation of the origin of the leukemia after

transplantation. The improvement in cytogenetic and molecular analysis such as short tandem repeat (STR) sequencing has provided more accurate and faster determination of donor engraftment and also differentiation of DCL from host leukemia relapse.

We report here the case of a 5-year-old girl who developed donor cell-derived acute myeloblastic leukemia (AML) after HLA-match sibling peripheral blood HSCT for juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). To our knowledge, this is the first case of a DCL developing after peripheral blood HSCT for JMML.

CASE REPORT

In March 2003, a 5-year-old girl was admitted to hospital with severe bone pain. She was diagnosed as JMML according to the international diagnostic criteria.² She began induction therapy consisting of Ara-C, vepesid. Between the first and the second consolidation therapies, hepatosplenomegaly became evident and laboratory findings included a white blood cell (WBC) count 25000/μL with 26% monocytes. She was accepted as having relapsed and was referred to our center for HSCT from her HLA-matched sister. During physical examination, her spleen was found to be extended to the pelvic brim and her liver was approximately 8 cm in diameter in midclavicular line below the costal margin. There were also extensive skin lesions in the form of plaques, which were not revealed as malignant infiltrates by skin biopsy. She did not have any clinical evidence of genetic conditions predisposing her to JMML. Laboratory values were as follows: hemoglobin 11.5 g/dL with a history of recent transfusion, platelet counts of 42000/μL, and WBC count 25700/μL. The blood smear showed a range of precursor and mature neutrophils and occasional nucleated red blood cells (2/100). Absolute monocyte count was 2060/μL. Her hemoglobin F level was 9%. The bone marrow had 8% blasts. Cytogenetic analyses of unstimulated uncultured bone marrow and phytohemagglutinin stimulated peripheral blood samples revealed normal karyotype (46, XX). Monosomies of chromosomes 5, 7 and trisomy of chromosome 8 were ruled out by fluorescent in situ hybridization (FISH) using centromeric probes for chromosomes 5, 7, and 8 (Vysis, Downer Grove, IL). She received 2 cycles of induction therapies consisting of cytarabine, etoposide, and daunorubicine. After written informed consent was provided by the patient's parent, she underwent peripheral blood HSCT following an ablative conditioning regimen consisting of 4 days of busulfan (4 mg/kg/d), 2 days of cyclophosphamide (60 mg/kg/d), and 1 day of melphelan with

Received for publication July 1, 2005; accepted September 19, 2006.
From the Departments of *Pediatrics; and †Medical Biology and Genetics, Akdeniz University, Antalya, Turkey.

Supported by Akdeniz University Scientific Research Project Management Unit.

Reprints: Volkan Hazar, MD, Department of Pediatrics, Akdeniz University, 07070, Antalya, Turkey (e-mail: volkan_hazar@yahoo.com).

Copyright © 2006 by Lippincott Williams & Wilkins

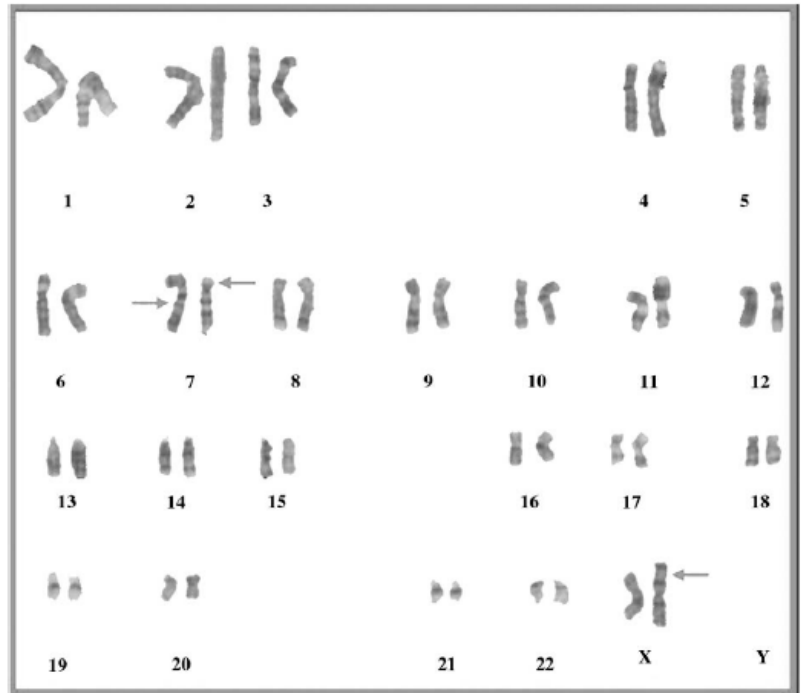


FIGURE 1. G-bands by trypsin using Giemsa banded karyotype of leukemia cells obtained ten months after the first stem cell transplantation.

a total dosage of 140 mg/m². On July 30, 2003, she was infused with 11×10^8 mononuclear cells/kg and 6.8×10^6 CD34⁺ cells/kg from her 11-year old, healthy, HLA identical sister donor after a 5-day granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) (10 µg/kg/d) mobilization. Methotrexate and cyclosporine were administered for graft versus host disease (GVHD) prophylaxis. After transplantation, neutrophil and platelet engraftments were observed by day 12 and 23, respectively. She did not experience any signs or symptoms of GVHD. On the 29th day after transplantation, there was no abnormality in her peripheral smear. Chimerism analyses conducted by the AmpFISTR Identifier PCR Amplification kit revealed 100% donor chimerism. Hemoglobin F was negative. One month later, she was admitted due to having suffered from symptoms of not only fever but cough and her chest radiography revealed bilateral pneumonic infiltrations. She was hospitalized for parenteral antibiotic treatment. By having 2 consecutive galactomannan positivity and nodular infiltrations conducted by high-resolution computerized tomography, she was diagnosed to have probable pulmonary aspergillosis and Amphotericin B was administered, to which she responded. Upon completion of the therapy, she was discharged as being well and in remission. She did well for 2 months until December 17, 2003, when hemoglobin and platelet counts were seen to decrease and spleen size was observed to have increased. Laboratory values were as follows: hemoglobin 5.4 g/dL, platelet count 87000/µL, and WBC count 11000/µL. The peripheral blood smear showed 5% blast cells and 3/100 nucleated red blood cells. Peripheral blood chimerism was found as 18% donor and cyclosporine was thus stopped. Donor lymphocyte infusion was planned to obtain graft versus leukemia. On December 22 and 25, 2003, she was infused with G-CSF mobilized donor lymphocyte with a total dosage of

0.75×10^8 CD3 cell/kg. Forty-seven days after the last donor lymphocyte infusion, peripheral blood chimerism was found to be 67% donor. After a stable period, hepatosplenomegaly again became unusual and transfusion dependency developed. Bone marrow aspiration showed 16% blast cells. Phytohemagglutinin stimulated peripheral blood cells (41%) and bone marrow cells (86%) showed abnormal karyotype and multicolor-FISH (M-FISH) was applied by using a SpectroVysion probe mix (Vysis, Downer Grove, IL). After M-FISH application, her karyotype was designed as; 46, X, t(X;7)(p21;p11.2), der(7)t(3;7)(q13.3;q22) (Figs. 1, 2). Hemoglobin F was negative. After splenectomy, she underwent a second transplantation from same donor. The patient was given a conditioning regimen of total body irradiation (totally 1200 cGy) followed by cyclophosphamide, 60 mg/kg/d, intravenously for 2 consecutive days. After G-CSF mobilization from the donor, she was infused with 13.5×10^8 mononuclear cells/kg and 5.7×10^6 CD34⁺ cells/kg from the same donor. Cyclosporine and methotrexate were used for GVHD prophylaxis. Neutrophil engraftment was conducted on posttransplant day 11, but platelet engraftment was not successful. Peripheral blood in the first month after transplantation showed 100% donor chimerism. A total of 7 STR loci, that is D8S1179, D21S11, D7S820, D13S317, D19S433, vWA, and D18S51, were found to be informative while other STR and amelogenin loci were noninformative (Fig. 3). At the same time, conventional cytogenetic and M-FISH studies revealed highly complex chromosomal aberrations including those that had been observed in the previous karyotype. She became febrile with the signs of pulmonary infection. High-resolution computed tomography showed nodular infiltrations suggesting fungal infection. While dealing with the infection, WBC started to

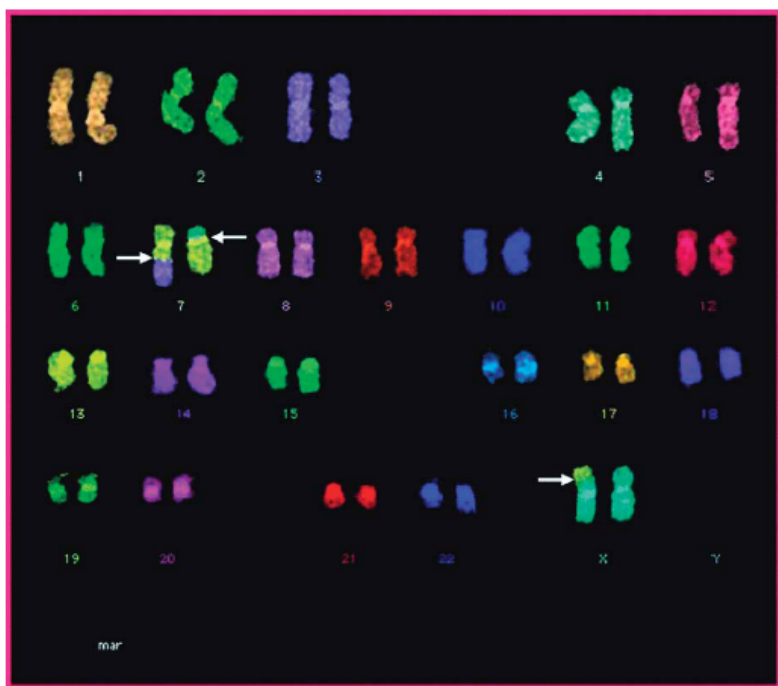


FIGURE 2. M-FISH karyotype of leukemia cells obtained 10 months after the first stem cell transplantation.

increase and blast cells appeared in peripheral blood. Bone marrow aspiration showed 48% blast, most of which were cells of medium to large size that had folded or had cleft nuclei and were stained with Sudan black. Dysgranulopoiesis with hypogranulation and dyserythropoiesis with megaloblastoid maturation and nuclear budding were also observed. The immunophenotype of blastic population was observed to be as follows: CD7, 50%; CD13, 66%; CD33, 64%; HLADR, 50%; CD34, 54%; and CD45, 85%, suggesting acute myeloid leukemia with CD7 expression. The patient succumbed to sepsis.

MATERIALS AND METHODS

Cytogenetics

Chromosome analysis was applied by G-bands by trypsin using Giemsa banding of chromosomes having been obtained from unstimulated uncultured marrow specimens and phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood cultures. At least 20 metaphases were analyzed from each of the specimens.

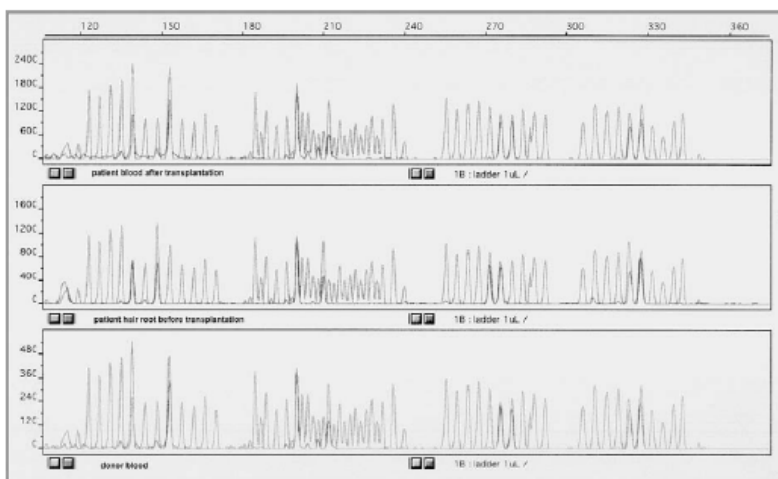


FIGURE 3. Chimerism analyzes results at 1 month after the second stem cell transplantation.

FISH

FISH studies were applied on bone marrow chromosomes of the patient using whole chromosome painting probes specific to chromosomes 5, 7, and 8 (Vysis, Downer Grove, IL) in accordance with the manufacturer's instructions at the time of JMML diagnosis. Data were collected on a fluorescence microscope (Zeiss Axioplan) equipped with a CCD camera (Photometrics Sensys) run by MacProbe software v.4.1.

M-FISH

M-FISH was applied using a SpectraVysion probe mix (Vysis) in accordance with the manufacturer's instructions to resolve complex chromosomal rearrangements. At least 5 metaphases were analyzed from M-FISH applied slides using the PowerGene M-FISH software (Applied Imaging).

STR Sequence Marker Studies

All extracted genomic DNA from blood and hair root samples were quantitated and diluted to optimal working concentrations. Fifteen tetranucleotide repeat loci (CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX, and vWA) and the Amelogenin gender determining marker in a single PCR amplification were amplified by using the AmpFISTR Identifier PCR Amplification Kit. STR polymorphisms were analyzed on an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer system. Calculations were based on relative areas of the donor and recipient peaks.

DISCUSSION

DCL has been reported sporadically since the first such reported case in 1971.³ Although cytogenetic studies evaluating sex-mismatched donor/recipient pairs and/or polymorphism were used to differentiate DCL from host leukemia relapse until 1985, in recent reports, molecular engraftment studies have been used for describing DCL.³⁻¹⁵ Twenty-five previously reported DCL cases in English Medical literature include 13 female and 12 male patients with a median age of 26 years (range 3 to 50 y).⁸⁻¹⁵ Nine patients were 16 years of age or younger. Bone marrow was used for the source of HSCT for all such cases. Bone marrow transplantation (BMT) was used for acute lymphoblastic leukemia in 9, AML in 5, chronic myelocytic leukemia in 8, chronic lymphocytic leukemia in 1, aplastic anemia in 1, and thalassemia in 1. The time interval from BMT to diagnosis of DCL ranged from 2 to 135 months (median 26 mo). The DCL was the same cell type as the pre-BMT leukemia in 10 of the 23 identified leukemic patients. Of the 2 patients transplanted for benign hematologic disorders, one developed acute lymphoblastic leukemia and the other AML.

In the patient reported here, the posttransplant acute leukemia appeared to be myeloid in type and derived from donor cells. The donor origin of hemopoiesis has been proved by donor-specific STR. In our patient, the conventional cytogenetic and FISH studies

performed before transplantation showed a normal female karyotype and ruled out monosomies 5, 7, and trisomy of chromosome 8. Conventional cytogenetic and M-FISH data after peripheral blood HSCT suggested potential new clonal abnormalities indicating that the patient had a "new" leukemia. We performed hybridization of STR sequence markers to DNA from the donor peripheral blood, the host peripheral blood including leukemic blasts and hair root samples from the host. This hybridization showed that the leukemic blood DNA matched the donor blood DNA and not the patient's DNA, thus confirming DCL. Our case had t(X;7)(p21;p11.2) translocation in her donor originated leukemia cells. 7p 11 harbors the GRB-10 gene which is an adapter protein interacting with several signaling proteins via its conserved domains playing a key role in the upstream of RAS signaling pathway.¹⁶ A recent study has shown that this protein is overexpressed in bone marrow samples of AML cases.¹⁷ This might be associated with the development of AML in donor cells. Other interesting cytogenetic findings in our case were partial monosomy 7q and partial trisomy 3q due to der(7) t(3;7)(q13.3;q22) derivative chromosome. Monosomy 7/partial monosomy 7q is one of the most common recurring chromosomal abnormalities in both childhood AML and JMML patients.¹⁸⁻²⁰ We did not observe a deletion on the long arm of the chromosome 7 by FISH studies at the time of the diagnosis of JMML in our case, suggesting that der(7) t(3;7)(q13.3;q22) derivative chromosome had accompanied the donor cell derived AML development. In contrast with a previous report documenting a negative impact of abnormal karyotype on the probability of overall survival after HSCT,²¹ the results of the EWOG-MDS/EBMT trial showed that monosomy 7 did not confer a worse prognosis.²⁰ Chromosome 3q rearrangements including 3q deletions have been described in approximately 2% of AML patients and these chromosomal abnormalities associated with the poor prognosis.²² To our knowledge, only 2 JMML cases with partial trisomy 3q have been published.^{23,24} These cases had partial trisomy 3q due to different derivative chromosomes which were der(12)t(3;12) and der(15)t(3;15).

Despite its rarity, DCL has stimulated interest because of the expectation that it might provide very important insights into the process of leukemogenesis.⁸ Several mechanisms have been postulated for the post-BMT development of leukemia in donor cells. Firstly, because most reported cases to date have been in the setting of an HLA-matched sibling; genetic factors seem to play an important role in the development of DCL.¹³ There are 3 reports in the literature describing the occurrence of leukemia in donors and DCL in their donated cells which point to the role of genetic background for the development of DCL.^{13,25,26} However, genetic familial predisposition is not the only risk factor for this rare event being a conditional to a case with DCL after unrelated BMT.¹⁰ It is speculated that some transplant-related factors could also be responsible for

the development of leukemia in donor cells. Transfer of oncogenic material from host to donor cells due to conditioning therapy, particularly total body irradiation, is one of the transplant-related factors.^{3,4,13} Radiation-induced microenvironment damage could support leukemic transformation in the donor cells as shown in the mouse model.¹³ Fusion of residual host cells with donor cells is the other postulated mechanism whereby host material could be transferred to donor cells.²⁷ Both bilineage dysplastic changes in our patient's bone marrow at the time of diagnosis of leukemia and partial monosomy 7q, which is one of the most common cytogenetic anomalies associated with treatment related AML,²⁸ may result from previous conditioning therapy including alkylators and may have played an important role in the development of DCL.

Another suggested mechanism for the development of DCL is occult leukemia in the donor. Despite a report of AML that was inadvertently transmitted by BMT, none of the marrow donors developed leukemia.²⁹ Impaired immune surveillance and telomere shortening could also serve as other contributing factors for the development of DCL in the donor cells.^{8,13}

In conclusion, the hypotheses contributing to how DCL develops have not yet been proven. Accumulation of similar cases will help us to understand the pathogenesis of leukemia.

REFERENCES

1. Boyd CN, Ramberg RC, Thomas ED. The incidence of recurrence of leukemia in donor cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Res.* 1982;6:833-837.
2. Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia.* 2003;17:277-282.
3. Fialkow PJ, Thomas ED, Bryant JI, et al. Leukaemic transformation of engrafted human marrow cells in vivo. *Lancet.* 1971;1:251-255.
4. Thomas ED, Bryant JI, Buckner CD, et al. Leukaemic transformation of engrafted human marrow cells in vivo. *Lancet.* 1972;1:1310-1313.
5. Goh K, Klemperer MR. In vivo leukemic transformation: cytogenetic evidence of in vivo leukemic transformation of engrafted marrow cells. *Am J Hematol.* 1977;2:283-290.
6. Elfenbein GJ, Brogaonkar DS, Bias WB, et al. Cytogenetic evidence for recurrence of acute myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation in donor hematopoietic cells. *Blood.* 1978;52:627-635.
7. Newburger PE, Latt SA, Pesando JM, et al. Leukemia relapse in donor cells after allogeneic bone marrow transplantation. *New Eng J Med.* 1984;310:903-906.
8. Cooley LD, Sears DA, Udden MM, et al. Donor cell leukemia: report a case occurring 11 years after allogeneic bone marrow transplantation and review of the literature. *Am J Hematol.* 2000; 63:46-53.
9. Saito Y, Uzuka Y, Sakai N, et al. A Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia of donor origin after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25: 1209-1211.
10. Hambach L, Eder M, Dammann E, et al. Donor cell-derived acute myeloid leukemia developing 14 months after matched unrelated bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28:705-707.
11. Gopcsa L, Barta A, Banyai A, et al. Acute myeloid leukemia of donor cell origin developing 5 years after allogeneic bone marrow

- transplantation for chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2002;29:449-452.
12. Brunstein CG, Hirsch BA, Hammerschmidt D, et al. Leukemia in donor cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant.* 2002;29:999-1003.
13. Bielorai B, Deeg HJ, Weintraub M, et al. B-cell lymphoma developing in the donor 9 years after donor-origin acute myeloid leukemia post bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31:931-934.
14. Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Sakellari I, et al. Development of BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia in donor cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2004;34:189-191.
15. Daly AS, Kamel-Reid S, Lipton JH, et al. Acute leukemia of donor origin arising after stem cell transplantation for acute promyelocytic leukemia. *Leukemia Res.* 2004;28:1107-1111.
16. Arnaud P, Monk D, Hitchens M, et al. Conserved methylation imprints in the human and mouse GRB10 genes with divergent allelic expression suggests differential reading of the same mark. *Hum Mol Genet.* 2003;12:1005-1019.
17. Casas S, Ollila J, Aventin A, et al. Changes in apoptosis related pathways in acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;146:89-101.
18. Hasle H, Arico M, Basso G, et al. Myelodysplastic syndrome, juvenile myelomonocytic leukemia, and acute myeloid leukemia associated with complete or partial monosomy 7. European Working Group on MDS in Childhood (EWOG-MDS). *Leukemia.* 1999;13:376-385.
19. Luna-Fineman S, Shannon KM, Atwater SK, et al. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood: a study of 167 patients. *Blood.* 1999;93:459-466.
20. Locatelli F, Nollke P, Zecca M, et al. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): results of the EWOG-MDS/EBMT trial. *Blood.* 2005;105:409-410.
21. Manabe A, Okamura J, Yumura-Yagi K, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for 27 children with juvenile myelomonocytic leukemia diagnosed based on the criteria of the International JMML Working Group. *Leukemia.* 2002;16:645-649.
22. Charrin C, Belhabri A, Treille-Ritouet D, et al. Structural rearrangements of chromosome 3 in 57 patients with acute myeloid leukemia: clinical, hematological and cytogenetic features. *Hematol J.* 2002;3:21-31.
23. Michalova K, Bartsch O, Stary J, et al. Partial trisomy of 3q detected by chromosome painting in a case of juvenile chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1993;71:67-70.
24. Tosi S, Mosna G, Cazzaniga G, et al. Unbalanced t(3;12) in a case of juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) results in partial trisomy of 3q as defined by FISH. *Leukemia.* 1997;11:1465-1468.
25. Lowsky R, Fyles G, Minden M, et al. Detection of donor cell derived acute myelogenous leukemia in a patient transplanted for chronic myelogenous leukemia using fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol.* 1996;93:163-165.
26. Berg KD, Brinster NK, Huhn KM, et al. Transmission of a T-cell lymphoma by allogeneic bone marrow transplantation. *N Eng J Med.* 2001;345:1458-1463.
27. McCann SR, Lawler M, Humphries PM, et al. Recurrence of Philadelphia chromosome-positive leukemia in donor cells after marrow transplantation for chronic granulocytic leukemia: confirmation by microsatellite studies (letter). *Blood.* 1992;79:2803-2805.
28. Mauritzson N, Albin M, Rylander L, et al. Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001. *Leukemia.* 2002;16:2366-2378.
29. Niederwieser DW, Appelbaum FR, Gastl G, et al. Inadvertent transmission of a donor's acute myeloid leukemia in bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *New Eng J Med.* 1990;322:1794-1796.

PARTIAL TRISOMY 4(q31qter) DUE TO MATERNAL 4;5 BALANCED TRANSLOCATION IN A NEONATE

BY D.A. ŞENSES¹, F. SILAN², H. UZUN¹, D. ALAGÖZ¹, C. ZAFER²,
K. KOCABAY¹, S.B. KARAÜZÜM³ AND Z. ÇETİN³

Summary: *Partial trisomy 4(q31qter) due to maternal 4;5 balanced translocation in a neonate:* We describe a male neonate with a duplication of 4(q31.3qter) due to unbalanced segregation of a maternal translocation (4;5)(q31.3;p15.1). He has a high broad nasal bridge, large, low-set ears, epicanthal folds, long philtrum, retrognathia, high arched palate, wide-spaced nipples, bilateral single transverse palmar creases, bilateral clinodactyly of the fifth finger, right cryptorchidism, and ventricular and secundum type atrial septal defect.

Key Words: 4q trisomy - Duplication of 4q - Unbalanced translocation of 4q

INTRODUCTION

Trisomy 4q has been reported in more than 70 cases (2, 5, 8, 9, 15, 16, 21, 23, 28). As only few cases were due to pure duplication and de novo translocation, most of them were unbalanced translocations due to a parental balanced translocation. Although most of the clinical features in the cases from familial translocation are a result of duplication, some of them are due to partial small monosomy of derivative chromosome. Also, in all cases the length of the duplicated segment is different. So, the clinical picture is variable. We present a male neonate with trisomy 4(q31.3-qter) due to unbalanced translocation 4;5 (q31.3;p15.1) and review the clinical features of previously reported cases in the literature.

CASE REPORT

The infant was born at 38 weeks of gestation to a 26-year-old mother, gravida 2, trans vaginally. The parents were healthy and nonconsanguineous. His birth weight, length and head circumference were 1870 g (<3rd centile), 38 cm (<3rd centile) and 29.5 cm (<3rd centile), respectively. On examination, he had a high broad nasal bridge, large, low-set ears (especially right ear), epicanthal folds, long philtrum, retrognathia, high arched palate, wide spaced nipples, bilateral single

(1) Department of Pediatrics, Düzce University, School of Medicine, Düzce, Turkey.

(2) Department of Human Genetics, Düzce University, School of Medicine, Düzce, Turkey.

(3) Department of Medical Biology and Genetics, Akdeniz University, School of Medicine, Antalya Turkey.

transverse palmar creases, bilateral clinodactyly of the fifth finger, and right cryptorchidism, (Figs 1, 2). Cranial and abdominal ultrasound examination showed no abnormality. Echocardiographic evaluation revealed ventricular and secundum type atrial septal defect.

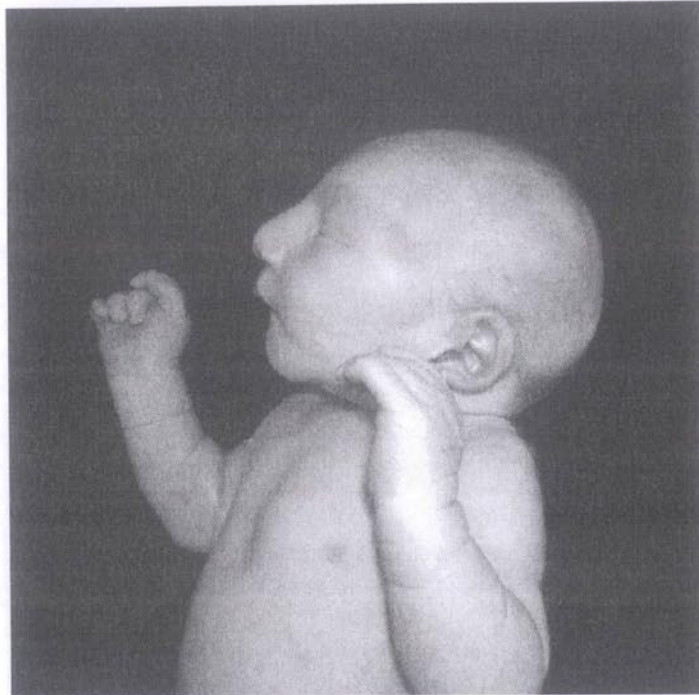


Figure 1: Appearance of the face of the case

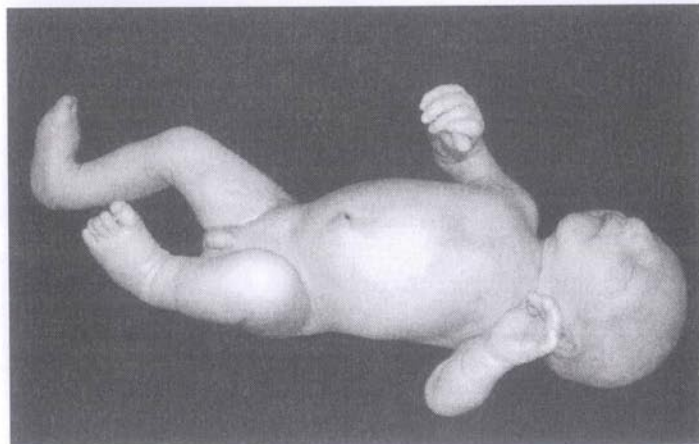


Figure 2: Appearance of the infant

CYTOGENETIC ANALYSIS

Peripheral blood samples were obtained from the proband, his parents and his healthy sister. Whole blood lymphocytes were cultured under stimulation with phytohemagglutinin by standart methods. Cytogenetic analysis of metaphase chromosomes was performed by GTG banding. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analyses performed using whole chromosome painting (wcp) probes for chromosomes 4 and 5 (Vysis). Metaphases were analyzed under an Zeiss Axioplane 2 epifluorescence microscope equipped with appropriate filter combinations. Patient's chromosome analysis showed a derivative chromosome 5 with extrachromosomal material attached to 5p (Fig. 3A). The cytogenetic origin of the extrachromosomal material was indeterminate, therefore parental chromosomes were studied. While the father had a normal karyotype, the mother was carrier of a balanced reciprocal translocation between chromosomes 4 and 5 [46,XX,t(4;5)(q31.3;p15.1)] (Fig. 3B), and the patient's karyotype was 46,XY,der(5)t(4;5)(q31.3;p15.1)mat. ish der(5)t(4;5)(wcp4+;wcp5+), (Fig. 4A, B).

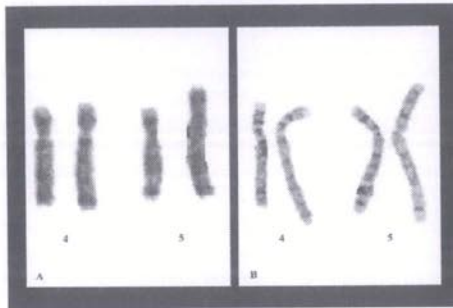


Figure 3: A) Partial G banded karyotype of the infant showing der(5)t(4;5)(q31.3;p15.1); B) Partial G banded karyotype of the mother showing t(4;5)(q31.3;p15.1)

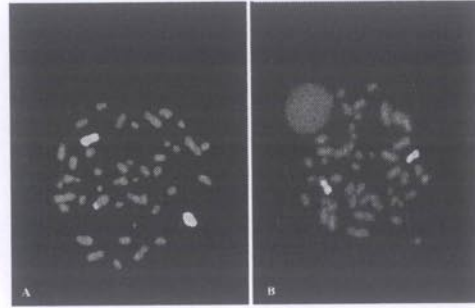


Figure 4: A) Infant's FISH with wcp4; B) Infant's FISH with wcp5

DISCUSSION

Partial 4q trisomy usually results from an unbalanced segregation of a balanced translocation in a parent. Multiple different chromosomes [1-3, 5, 9, 11-15, 18, 20-22, X] were reported to be rearranged with 4q (1, 3, 5, 6, 13, 19, 22, 25, 26, 30). However, there is a slightly stronger predilection of 4q for chromosome 18 (4, 5). There is a small monosomy for these derivative chromosomes. In the cases, the involved breakpoints vary, and the length of the duplicated segment is different.

Consequently, the clinical findings are variable. The most consistent clinical features are psychomotor and growth retardation, abnormal nasal bridge, large, low set, malformed ears, short neck, cryptorchidism (5). Other common findings include microcephaly, micrognathia, congenital heart defects, single palmar crease, epicanthal folds, inguinal or umbilical hernias, hypertelorism, downturned mouth, high or cleft palate, intrauterine growth retardation, downslanting palpebral fissures, renal abnormalities, preaxial limb defects, seizures and ptosis (5). Because most cases involve a small monosomy for another chromosome, complete phenotype mapping from these findings lacks precision. Features of the cases with pure duplication are exactly assisted for phenotype mapping. We found 17 cases with pure 4q duplication reported in the literature (7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 18, 20, 21, 24, 27, 29, 31), Table I. According to these cases' findings, psychomotor retardation and abnormal nasal bridge (14/17) are the most frequent features. Other features include large, low-set ears (11/17), epicanthal folds (11/17), growth retardation (10/17), short philtrum (7/17), preaxial limb defect (6/17), seizures (6/17), microcephaly (6/17), micrognathia (6/17), renal hypoplasia (6/17), ptosis (5/17), congenital heart defect (3/17), short neck (3/17), single palmar crease (3/17), clinodactyly (3/17), cryptorchidism (2/17). The findings of the cases with 4q trisomy due to unbalanced translocation are mostly similar to the cases with pure duplication.

There is wide phenotypic variability in the cases with partial 4q trisomy. Nevertheless psychomotor retardation and abnormal nasal bridge are consistent findings. In our patient abnormal nasal bridge is a striking finding, too. The clinical variability might be related to the regions of the duplicated segment. Intrauterine and postnatal growth retardation, short philtrum, downturned mouth, downslanting palpebral fissures, and abnormal thumbs are more common in patients with duplications beginning proximal to 4q28 (5). Wide-spaced nipples and large ears are seen more frequently in duplications beginning at 4q28. In the cases with minimally duplicated region as q31.3q33 (18), q12q13 (24) and q31.1q32.3 (11), it was shown mild clinical effect. Also, mild clinical phenotype in a case with large duplication (q25q34) was reported (8). Endocrine abnormalities in a case (1) and choanal atresia in two cases (15, 30) had been showed.

Thumb anomaly, renal hypoplasia and congenital cardiac defects are specific anomalies of 4q trisomy. Most of the patients with thumb anomaly have renal hypoplasia. Initially, Zollino *et al.* described this relationship and suggested that the 4q22-q23 region was involved in the development of these anomalies (31). Nevertheless, now there seems to be enough evidence that this region is more distal (q28.2-q28.3 and

Table 1. Clinical manifestations and duplicated segment in patients with pure 4q duplication

	Dutheilux <i>et al.</i> 1975 (7)	Vogel <i>et al.</i> 1975 (29)	Taylor <i>et al.</i> 1977 (27)	Fryns <i>et al.</i> 1980 (10)	Halal <i>et al.</i> 1991 (12)	Jeziorowska <i>et al.</i> 1993 (14)	Zollino <i>et al.</i> 1995 (31)	Navarro <i>et al.</i> 1996 (20)
Duplicated Segment	q25-q34	q22-q34	q26-q35	q25-q31	q23-q27	q21.3-q31.3	q13.1-q22.2	q21-q28
Psychomotor retardation	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth retardation	+	+	+	+	+	+	+	+
Microcephaly	+	+	+	+	+	+	+	+
Epicambic folds	+	+	+	+	+	+	+	+
Picus								
Downward slanting palpebral fiss.								
High nasal bridge	+	+	+	+	+	+	+	+
Depressed nasal bridge	+	+	+	+	+	+	+	+
Low set/malformed ears	+	+	+	+	+	+	+	+
Short philtrum	+	+	+	+	+	+	+	+
Micrognathia								
Down turned mouth								
High arched palate								
Short neck								
Single palmar crease								
Thumb anomalies								
Clinodactyly of 5th finger								
Toe anomaly								
Toe nail hypoplasia								
Cryptorchidism								
Congenital heart defect			+		+			
Renal hypoplasia			+					
Seizures								
Hearing impairment								
Inguinal hernia								
Unilateral hernia								

Table 1 continued:

	Goodman <i>et al.</i> 1997a (11) q31.1-q32.3	Goodman <i>et al.</i> 1997b (11) q31.1-q32.1	Shashi <i>et al.</i> 1999 (24) q12-q13	Mattby <i>et al.</i> 1999a (18) q31.3-q33	Mattby <i>et al.</i> 1999b (18) q31.3-q33	Elghazal <i>et al.</i> 2004 (8) q25-q34	Lin <i>et al.</i> 2004 (15) q28.1-q35	Otsuka <i>et al.</i> 2005a (21) q31.2-q35.2	Otsuka <i>et al.</i> 2005b (21) q31.2-q35.2
Duplicated Segment	+	+	+						
Psychomotor retardation	+							+	+
Growth retardation	+							+	+
Microcephaly		+						+	+
Epicambic folds						+		+	+
Poils									
Downward slanting palpebral fiss									
High nasal bridge									
Depressed nasal bridge	+								
Low set/naled/formed ears									
Short philtrum									
Micrognathia									
Down turned mouth									
High arched palate									
Short neck									
Single palmar crease									
Thumb anomalies	+								
Clinodactyly of 5th finger									
Toe anomaly									
Toe nail hypoplasia									
Cryptorchidism									
Congenital heart defect									
Renal hypoplasia	+								
Seizures									
Hearing impairment									
Inguinal hernia									
Umbilical hernia									

q31.22-q32) (2, 17, 21). In our case, these specific malformations were not found. However, microcephaly, intrauterine growth retardation and most of the dysmorphic findings were diagnosed. We believe that psychomotor and growth retardation will develop.

In conclusion, psychomotor retardation and abnormal nasal bridge are the most frequent clinical findings. Low set/malformed ears, epicanthal fold and growth retardation are other common clinical findings.

REFERENCES

1. ANGULO M.A., CASTRO-MAGANA M., SHERMAN J., COLLIPP P.J., MILSON J., TRUNCA C., DERENONCOURT A.N.: Endocrin abnormalities in a patient with partial trisomy 4q. *J. Med. Genet.*, 1984, 21, 303-307.
2. BATTAGLIA A., CHEN Z., BROTHMAN A.R., MORELLI S., PALUMBOS J.C., CAREV J.C., HUDGINS L., DISTECHE C.: Karyotype/phenotype correlations in duplication 4q: evidence for a critical region within 4q27-28 for preaxial defects. *Am. J. Med. Genet. A*, 2005, 134, 334-337.
3. BIEDERMAN B., BOWEN P.: Partial trisomy 4q due to familial 2/4 translocation. *Hum. Genet.*, 1976, 33, 147-153.
4. BONEFANTE A., STELLA M., ROSSI G.: Partial trisomy 4q: two cases resulting from a familial translocation t(4;18)(q27;p11). *Hum. Genet.*, 1979, 52, 85-90.
5. CELLE L., LEE L., RINTOUL N., SAVANI R.C., LONG W., MENNUTI M.T., KRANTZ I.D.: Duplication of chromosome region 4q28.3-qter in monozygotic twins with discordant phenotypes. *Am. J. Med. Genet.*, 2000, 94, 125-140.
6. CERVENKA J., DIAVADI G.B., GORLIN R.J.: Partial trisomy 4q syndrome: case report and review. *Hum. Genet.*, 1976, 34, 1-7.
7. DUTRILLAUX B., LAURENT C., FORABOSCO A., NOEL B., SUERINE E., BIEMONT M.C., COTTON J.B.: Partial 4q trisomy. Apropos of 3 cases. *Ann. Genet.*, 1975, 18, 21-27.
8. ELGHEZAL H., SENDI H.S., MONASTIRI K., LA-PIERRE J.M., ROMDHANE S.I., MOUGOU S., SAAD A.: Large duplication 4q25-q34 with mild clinical effect. *Ann. Genet.*, 2004, 47, 419-422.
9. FRANCISCO-BAGNARIOLLI A.M., PAYAO S.L.M., KAWASAKI-OYAMA R.S., SABBAG FILHO D., SEGATO R., DE LABIO R.W., CHAUFFAILLE M.L., PRIEST J.H.: High risk for unbalanced segregation of some reciprocal translocations: a large pedigree containing distal 4q trisomy from t(4;7)(q28;p22). *Am. J. Med. Genet.*, 2001, 103, 302-307.
10. FRYNS J.P., VAN DEN BERGHE H.: Partial duplication of the long arm of chromosome 4. *Ann. Genet.*, 1980, 23, 52-53.
11. GOODMAN B.K., CAPONE G.T., HENNESSEV J., THOMAS G.H.: Familial tandem duplication of bands q31.1 to q32.3 on chromosome 4 with mild phenotypic effect. *Am. J. Med. Genet.*, 1997, 73, 119-124.
12. HALAL F., VEKEMANS M., CHITAYAD D.: Interstitial tandem direct duplication of the long arm of chromosome 4 (q23-q27) and possible assignment of the structural gene encoding human aspartylglucosaminidase to this segment. *Am. J. Med. Genet.*, 1991, 39, 418-421.
13. HEGMANN K.M., SPIKES A.S., ORR-URTREGER A., SHAFFER L.G.: Segregation of a paternal interstitial translocation results in partial 4q monosomy or 4q trisomy in two siblings. *Am. J. Med. Genet.*, 1996, 61, 10-15.
14. JEZIOROWSKA A., CIESLA W., HOUCK G.E. Jr, YAO X.L., HARRIS M.S., TRUSZCZAK B., SKORSKI M., JAKUBOWSKI L., JENKINS E.C., KALUZEWSKI B.: Cytogenetic and molecular identification of a de novo direct duplication of the long arm of chromosome 4(q21.3-q31.3). *Am. J. Med. Genet.*, 1993, 46, 83-87.
15. LIN S., KIRK E.P.E., MCKENZIE F., FRANCIS C., SHALHOUB C., TURNER A.M.: De novo interstitial duplication 4(q28.1q35) associated with chonal atresia. *J. Paediatr. Child. Health.*, 2004, 40, 401-403.
16. LUNDIN C., ZECH L., SJORS K., WADELJUS C., ANNEREN G.: Trisomy 4q syndrome: presentation of a new case and review of the literature. *Ann. Genet.*, 2002, 45, 53-57.

17. LURIE I.W.: Partial trisomy 4q and preaxial limb defects. *Am. J. Med. Genet. A*, 2005, 138, 304-305.
18. MALTBY E.L., BARNES I.C.S., BENNETT C.P.: Duplication involving band 4q32 with minimal clinical effect. *Am. J. Med. Genet.*, 1999, 83, 431.
19. MIKELSAAR R.V., LURIE I.W., ILUS T.E.: Pure partial trisomy 4q25-qter owing to a de novo 4;22 translocation. *J. Med. Genet.*, 1996, 33, 344-345.
20. NAVARRO E.G., ROMERO M.C., EXPOSITO I.L., VELASCO C.M., LLAMAS J.G., RAMON F.J., JIMENEZ R.D.: De novo interstitial tandem duplication of chromosome 4(q21-q28). *Am. J. Med. Genet.*, 1996, 62, 297-299.
21. OTSUKA T., FUJINAKA H., IMAMURA M., TANAKA Y., HAYAKAWA H., TOMIZAWA S.: Duplication of chromosome 4q: renal pathology of two siblings. *Am. J. Med. Genet. A*, 2005, 134, 330-333.
22. PETIT P., MOERMAN P., FRYNS J.P.: The fetal phenotype of partial trisomy of the long arm of chromosome 4 (4q22-4qter). *Genet. Couns.*, 1991, 2, 163-165.
23. RINALDI R., De BERNARDO C., ASSUMMA M., GRAMMATICO B., BUFFONE E., POSCENTE M., GRAMMATICO P.: Cytogenetic and molecular characterization of a de novo 4q24qter duplication and correlation to the associated phenotype. *Am. J. Med. Genet. A*, 2003, 118, 122-126.
24. SHASHI V., BERRY M.N., SANTOS C., PETTENATI M.J.: Partial duplication of 4q12q13 leads to a mild phenotype. *Am. J. Med. Genet.*, 1999, 86, 51-53.
25. STELLA M., BONEANTE A., RONCONI G., ROSSI G.: Partial trisomy 4q: two cases with a familial translocation t(4;18)(q27;q23). *Hum. Genet.*, 1979, 47, 245-251.
26. STOLL C., ROTH M.P.: Partial 4q duplication due to inherited der(13)t(4;13)(q26;q34)mat in a girl with a deficiency of factor X. *Hum. Genet.*, 1980, 53, 303-304.
27. TAYLOR K.M., FRANCKE U., BROWN M.G., GEORGE D.L., KAUFHOLD M.: Inverted tandem (mirror) duplications in human chromosomes: -nv dup 8p, 4q, 22q. *Am. J. Med. Genet.*, 1977, 1, 3-19.
28. VELINOV M., GU H., YEBOA K., WARBURTON D., TUBO T., DHUPER S., LANTER S., DELPRINO D., KUPCHIK G., JENKINS E.C.: Hypoplastic left heart in a female infant with partial trisomy 4q due to de novo 4;21 translocation. *Am. J. Med. Genet.*, 2002, 107, 330-333.
29. VOGEL W., SIEBERS J.W., GUNKEL J.: Phenotypic variation in partial trisomy 4q. *Humangenetik.*, 1975, 28, 103-112.
30. WOUTERS C.H., Van BODEGOM T.M., MOLL H.A., GOVAERTS L.C.P.: Partial trisomy 4q and monosomy 9p resulting from a familial translocation t(4;9)(q27;p24) in a child with choanal atresia. *Ann. Genet.*, 1999, 42, 160-165.
31. ZOLLINO M., ZAMPINO G., TORRIOLI G., POMPONI M.G., NERI G.: Further contribution to the description of phenotypes associated with partial 4q duplication. *Am. J. Med. Genet.*, 1995, 57, 69-73.

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:

Dursun Ali ŞENSES
 Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi
 Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD
 81620 Konuralp/Düzce/Türkiye
 E-mail: sensesdali@yahoo.com
 Fax: +90 380 5414105

Original Article

Relationship between SP1 polymorphism and osteoporosis in β -thalassemia major patients

Ozlem Guzeloglu-kayisli,¹ Zafer Cetin,¹ Ibrahim Keser,¹ Zeynep Ozturk,² Tiraje Tuncer,³ Duran Canatan⁴ and Guven Luleci¹
Departments of ¹Medical Biology and Genetics, ²Pediatric Hematology and Oncology, and ³Physical Medicine and Rehabilitation, Akdeniz University, Faculty of Medicine, Antalya, Turkey and ⁴Thalassemia Center of the State Hospital, Antalya, Turkey

Abstract *Background:* β -Thalassemia is an autosomal recessive disease characterized by defective β -globin chain production. Osteoporosis is an important cause of morbidity in patients with β -thalassemia major. The pathogenesis of reduced bone mineral density (BMD) is multifactorial. A range of genetics factors have been implicated in other populations of patients with osteoporosis. Polymorphism at the Sp1 binding site of the collagen type I A1 (*COL1A1*) gene is thought to be an important factor in the development of osteoporosis.

Methods: Alleles *S* and *s*, detected by presence of a G or T nucleotide, respectively in a regulatory site of the *COL1A1* gene were investigated in 37 β -thalassemia major patients with osteoporosis and 92 controls without osteoporosis or osteopenia using polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism.

Results: Fifteen and nine β -thalassemia major patients displayed SS and Ss genotypes, respectively, whereas 13 were found to have an ss genotype. The mean BMD of the β -thalassemia major patients with ss genotype was similar to those with the Ss and SS genotypes. In the control group, 77 and 15 subjects had SS and Ss genotypes, respectively, with no ss genotype. Allelic and genotypic distribution in patients were significantly different from controls.

Conclusion: Determining base substitutions at the Sp1 binding site on the *COL1A1* gene in early years may be important in preventing osteoporosis in children with β -thalassemia major.

Key words β -thalassemia major, collagen type I A1, osteoporosis, polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism, Sp1 polymorphism.

β -Thalassemia is an inherited disorder with an autosomal recessive mode of inheritance and constitutes one of the most serious health problems worldwide, as well as in Antalya.¹ It is well known that increased erythropoiesis in bone marrow in β -thalassemic patients results in expansion of marrow cavity and reduced bone mass.² Regular blood transfusions from infancy until adulthood in β -thalassemia major patients have facilitated transformation of severe bone deformities into less marked skeletal lesions, such as osteoporosis.³

Osteoporosis is a common disease characterized by reduced bone mass, microarchitectural deterioration of bone tissue, and increased risk of fragility fractures.^{4,5} Genetic factors play an important role in the pathogenesis of osteoporosis, involving variation in several genes such as collagen type I A1 (*COL1A1*), vitamin D, estrogen receptors and interleukin (IL)-6 that regulate bone mineral density (BMD) and bone geometry and quality.⁶ One of the most important candidate genes for predisposition to osteoporosis is the *COL1A1* gene, which encodes the α -1(I)

protein chain of type I collagen, the major protein of bone. The G-T substitution at base 1 of intron 1 at the binding site of the Sp1 transcription factor of the *COL1A1* gene is a putative marker for low BMD and osteoporotic fractures. Several studies demonstrated that Sp1 polymorphism has been associated with low BMD and an increased risk of osteoporotic fracture in β -thalassemic patients in different populations.^{5,7}

Therefore, the aim of the present study was to examine the distribution of *COL1A1* polymorphism and its relationship with BMD at the lumbar spine and femur in 37 patients with β -thalassemia major compared to a control group in a Turkish population.

Methods

Patients

Blood samples were obtained from 37 transfusion-dependent patients (20 girls and 17 boys, mean age 13.5 ± 3.5 years) clinically diagnosed as having β -thalassemia major with osteoporosis at Thalassemia Center, Antalya State Hospital. All patients were treated with regular blood transfusions in order to maintain pre-transfused hemoglobin levels >9.5 g/dL, and with adequate chelation therapy using a combination of deferoxamine and deferiprone. None of them had any clinical and laboratory

Correspondence: Ibrahim Keser, PhD, Department of Medical Biology and Genetics, Akdeniz University, School of Medicine, Antalya TR-07070, Turkey. Email: keser@akdeniz.edu.tr

Received 22 November 2005; revised 12 March 2007; accepted 21 June 2007.

findings of endocrinopathy. BMD of the lumbar spine and femur was assessed on dual-energy X-ray absorptiometry (DPX-L Densitometer, Lunar, Madison, WI, USA) and provided as g/cm^2 . Blood samples from 92 healthy individuals (49 women and 43 men, mean age of 25.4 ± 5.0 years) without osteoporosis or osteopenia were used as a control group. All patients and healthy individuals gave informed consent form to participate in the present study, approved by Akdeniz University Ethics Committee.

DNA analysis

The DNA was isolated from peripheral blood samples of β -thalassemia major patients and control group by conventional salting-out methods as described previously.⁸ A 850 bp fragment including the intronic polymorphic region of the Sp1 binding site in the *COL1A1* gene was amplified on polymerase chain reaction (PCR) using forward (5'-AGC AGG TCC CCT TGG AAC CG-3') and reverse (5'-AC TCT GTC CGC TTG TCC CGC-3') primers. The expected size of the specific PCR product was 850 bp, which was digested overnight at 37°C with *BalI* restriction enzyme (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany). Digested products were visualized in 3% NuSieve agarose gel (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) using UV transilluminator (Hero Lab, Wiesloch, Germany). The *s* allele did not have the *BalI* restriction site, while the *S* allele was digested into 600 bp and 250 bp fragments by the same enzyme compared to molecular marker (Fermentas). β -Globin Strip Assay Kit (Vienna Lab, Vienna, Austria) based on reverse dot blot hybridization was used for detection of the 22 most common β -thalassemia mutations and sickle cell anemia mutation in the Mediterranean region.

Statistical analysis

The χ^2 test was used to compare allele and genotype frequencies between β -thalassemia major patients and controls. The Mann-Whitney *U*-test was used to compare BMD scores between genotypes in β -thalassemia major patients.

Results

Thirty-seven β -thalassemia major patients with osteoporosis and 92 healthy controls were studied using PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) to detect the Sp1 polymorphism in *COL1A1* gene. The different alleles were assessed according to the digestion pattern detected with the restriction enzyme *BalI*, a recognition site of which is present within the 850 bp-amplified region of the *COL1A1* gene. The *s* allele is said to be present if no digestion is observed, whereas an *S* allele is indicated in the case of digestion, producing two different-sized fragments (250 bp and 600 bp). The distribution of *COL1A1*

genotypes and allele frequencies in the β -thalassemia major patients and controls is given in Table 1. While the allelic frequencies in control group were 91.8% for *S* and 8.2% for *s*, frequencies of *S* and *s* alleles were found to be 52.7% and 47.3%, respectively, in the β -thalassemia major patients. Patients with β -thalassemia major had higher allelic frequencies for the *s* allele and *ss* genotype. Also, the allelic and genotype distributions were significantly different between osteoporotic β -thalassemia major patients and controls (Table 1, $P < 0.001$).

The BMD (expressed as *Z*-scores) of β -thalassemia major patients were in the range of -1.35 and -3.71 . No significant differences in lumbar or femoral BMD scores between genotypes were observed in the osteoporotic β -thalassemia major patients (Fig. 1). We did not observe any significant relationship between the genotypes obtained and the type of β -thalassemic mutations as a result of Sp1 polymorphism. Also, there were no data on bone fractures for the thalassaemic patients.

Discussion

Even though all of genes responsible for regulation of bone mass are non-identified, multiple factors such as polymorphisms in estrogen receptors, vitamin D receptor, *COL1A*, and *COL1A2* genes are believed to play a role in bone formation.⁹ Type I collagen, a protein encoded by *COL1A1* and *COL1A2* genes, is the major protein of the bone matrix, at 90%.¹⁰ The first intron of the *COL1A1* gene has previously been shown to be of importance in the regulation of collagen transcription. Recent studies have verified the association between polymorphism for the binding site of the transcription factor Sp1 in the first intron of the *COL1A1* gene, and bone mass in several populations.^{4,11-13}

Little information is available concerning the factors responsible for the development of osteoporosis, characterized by reduced bone mass, in β -thalassemia major. Several studies have shown that heterozygotes at the polymorphic Sp1 site (*Ss*) had significantly lower BMD than *SS* homozygotes, and bone mass was even lower in *ss* homozygotes in patients with β -thalassemia major.^{5,7} We analyzed the osteoporosis of the lumbar spine and femur at the presence of the Sp1 polymorphism. Of the present 37 β -thalassemia major patients, nine had the *Ss* (*G/T*) allele while 13 had the *ss* (*T/T*) alleles, and the remaining 15 had the *SS* (*G/G*) allele (Table 1). When the genotypes and BMD scores were compared in 37 β -thalassemia major patients with osteoporosis, there was no significant correlation between osteoporosis and genotype (Fig. 1).

In the present study population we observed *Ss* and *SS* genotypes in 24.3% and 40.5% of β -thalassaemic patients, and in 16% and 84% of the control group, respectively. The frequency of the

Table 1 Genotype and allele frequencies

	Alleles, <i>n</i> (%)			Genotype, <i>n</i> (%)	
	<i>S</i>	<i>s</i>	<i>SS</i>	<i>Ss</i>	<i>ss</i>
Controls (<i>n</i> = 92)	169 (91.8)	15 (8.2)	77 (84)	15 (16)	—
β -Thalassemia major patients (<i>n</i> = 37)	39 (52.7)	35 (47.3)	15 (40.5)	9 (24.3)	13 (35.2)

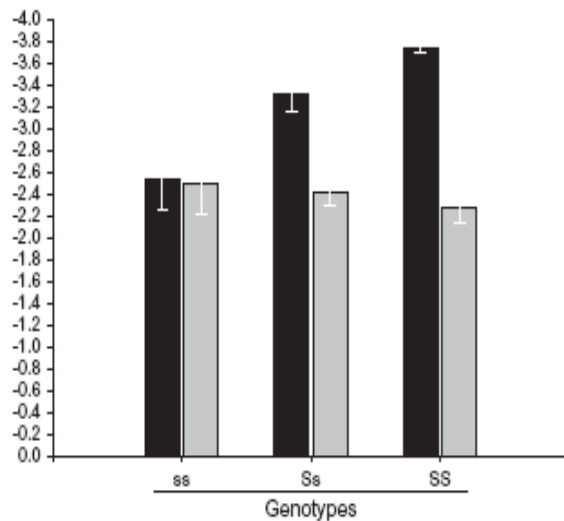


Fig. 1 Relationship between (■) lumbar and (□) femoral bone mineral density and collagen type I A1 (COLIA1) genotypes in patients with β -thalassemia major.

ss genotype was 35.2% in thalassaemic patients, while it was not detected in the control group (Table 1). When allelic frequency was compared between β -thalassemia major patients and controls we found the s allele to be higher in the β -thalassemia major patients. These results show that there was a significant correlation between allelic and genotypic distribution of Sp1 polymorphism. Also, we compared β -globin gene mutations and genotypic distribution of Sp1 polymorphism. IVS1.110 mutation was found to be the most common mutation, but a correlation was not found between β -globin gene mutation types and allelic distribution of Sp1 polymorphism.

The present results indicate that osteoporosis has a strong genetic component related with Sp1 polymorphism in children and young adults who had β -thalassemia major with severe osteoporosis. As a result, mutation at the Sp1 binding site on the COLIA1 gene should be detected early in order to initiate preventative therapy before fractures occur in children with β -thalassemia major. In addition to regular screening, preventive intervention (regular transfusion, chelation etc.) and early management of possible endocrine complications are important in order to secure normal bone health in children with β -thalassemia major. Genetic counseling should be given to

families with a β -thalassemia major child, in order to prevent osteoporosis.

Acknowledgments

We thank Dr Ozgur Tosun for help in statistical analysis. This work was supported by Akdeniz University Research Project Management Unit.

References

- Keser I, Sanlioglu AD, Manguoglu E *et al.* Molecular analysis of beta-thalassemia and sickle cell anemia in Antalya. *Acta Haematol.* 2004; **111**: 205–10.
- Vaskaridou E, Kyrtonis MC, Terpos E *et al.* Bone resorption is increased in young adults with thalassaemia major. *Br. J. Haematol.* 2002; **112**: 36–41.
- Wonke B. Annotation: bone disease in Thalassemia major. *Br. J. Haematol.* 1998; **103**: 897–901.
- Grant SF, Reid DM, Blake G *et al.* Reduced bone density osteoporosis associated with a polymorphic sp1 binding site in the collagen type a1 gene. *Nat. Genet.* 1996; **14**: 203–5.
- Perrotta S, Cappellini MD, Bertoldo F *et al.* Osteoporosis in β -thalassemia major patients: Analysis of the genetic background. *Br. J. Haematol.* 2000; **111**: 461–6.
- Ralston SH. Genetic control of susceptibility to osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; **86**: 2460–66.
- Wonke B, Jensen C, Hanslip JJ *et al.* Genetic and acquired predisposing factors and treatment of osteoporosis in thalassaemia major. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 1998; **3**: 795–801.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; **16**: 12–15.
- Eisman JA. Genetics of osteoporosis. *Endocr. Rev.* 1999; **20**: 788–804.
- Qureshi AM, Herd RJ, Blake GM *et al.* COLIA1 Sp1 polymorphism predicts response of femoral neck bone density to cyclical etidronate therapy. *Calcif. Tissue Int.* 2002; **70**: 158–63.
- Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q *et al.* Relation of alleles of the collagen type I alpha 1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.* 1998; **338**: 1016–21.
- Alvares K, Siddiqui F, Malone J, Veis A. Assembly of the type I procollagen molecule: Selectivity of the interactions between the alpha 1(I)- and alpha 2(I)-carboxyl propeptides. *Biochemistry* 1999; **38**: 5401–11.
- Bernad M, Martinez ME, Escalona M *et al.* Polymorphism in the type I collagen (COLIA1) gene and risk of fractures in postmenopausal women. *Bone* 2002; **30**: 223–8.

Effects of hormone replacement therapy on bone mineral density in Turkish patients with or without COL1A1 Sp1 binding site polymorphism

Mehmet Simsek¹, Zafer Cetin², Turker Bilgen², Omur Taskin¹, Guven Luleci² and Ibrahim Keser²

Departments of ¹Obstetrics and Gynecology, and ²Medical Genetics, Akdeniz University, School of Medicine, Antalya, Turkey

Abstract

Aim: To evaluate the effects of hormone replacement therapy (HRT) on bone mineral density (BMD) in patients with or without COL1A1 Sp1 binding site polymorphism.

Methods: Non-smoking otherwise healthy postmenopausal women ($n = 111$), who had not received any kind of HRT for at least 3 years (between 2002 and 2005) at the onset of menopause, were included. All patients received 0.625 mg conjugated estrogen/2.5 mg medroxyprogesterone for 18 months. BMD by dual X-ray absorptiometry was measured at the lumbar spine and the femur neck initially and after 18th months of treatment. COL1A1 Sp1 binding site polymorphism was studied using the PCR-RFLP method.

Results: After having the results of COL1A1 Sp1 binding site polymorphism, 79 (71.2%) patients were SS, 30 (27.0%) were Ss and two (1.8%) were homozygous for ss. The mean age, weight and length of menopausal period were similar between the SS and Ss patients. The Ss heterozygotes had lower BMD values both at the lumbar spine and at the femur neck compared with the SS patients. This difference was also reflected in post treatment measurements. The increase in BMD scores was higher in the SS homozygotes than in the Ss patients.

Conclusion: Our preliminary data supports the fact that HRT had a lower increase in BMD scores following 18 months of treatment in COL1A1 s allele individuals compared with normal SS individuals. Therefore our study may provide evidence that the Sp1 polymorphism may ameliorate the effects of HRT on BMD, suggesting some additional regimens may be used to support bone strength and to decrease osteoporotic fractures.

Key words: bone mineral density, COL1A1 polymorphism, hormone replacement therapy, postmenopausal women.

Introduction

Osteoporosis is a common condition with low bone mineral density (BMD) deterioration of the skeletal micro architecture and consequently increased risk of fracture. It affects up to 40% of women at some point, decreasing their quality of life. Use of antiosteoporotic therapy and hospitalization after fractures among elderly persons represent a major public health

problem with significant cost to the health system. Genetic factors are important in the pathogenesis, since 80% of variance in bone mass is under genetic control.¹ Less is known, however, about the possible roles of genetic factors in predicting a response to antiosteoporotic therapy. Although the genes regulating bone mass are incompletely defined, several candidate genes (Vitamin D receptor, the estrogen receptor, the COL1A1 gene, and transforming growth factor beta-1)

Received: March 7 2007.

Accepted: June 30 2007.

Reprint request to: Associate Professor Ibrahim Keser, Department of Medical Biology and Genetics, School of Medicine, Akdeniz University, TR-07070, Antalya, Turkey. Email: keser@akdeniz.edu.tr

contribute to osteoporosis, however each one has a relatively small effect on BMD and other determinants of fracture risk.^{1,2}

Collagen type I is an important component of the bone matrix. Previous works have identified polymorphism affecting Sp1 binding site in the transcriptional control region of the *COL1A1* gene. Alleles with a G-base at the Sp1 binding are defined as 'S', whereas alleles with a T-base are defined as 's'. Clinical studies have shown that patients with 's' allele are likely to have reduced BMD and osteoporotic fractures in several populations.³⁻⁶ Since estrogen deficiency as a consequence of menopause is a major risk factor for osteoporosis, one aim of postmenopausal hormone therapy is to protect against osteoporosis and consequent fractures. However, HRT and/or antiosteoporotic medications reveal increases in BMD with greater inter individual variance. Therefore, predicting response to osteoporotic treatments not only prevents fracture but will also reduce the cost of treatment and increase the effectiveness of therapy. *COL1A1* Sp1 alleles are determinants of bone mass and quality. Therefore, the aim of our study was to find out the effects of HRT on BMD in patients with or without *COL1A1* Sp1 binding site polymorphism and its possible role in bone collagen turnover in postmenopausal women with osteoporosis.

Materials and Methods

Non-smoking otherwise healthy postmenopausal women aged 46–54 years ($n = 111$) who had not received any kind of HRT for at least 3 years (between 2002 and 2005) at the onset of natural menopause were included. An informed consent was obtained to participate in the study, which had previously been approved by the local ethics committee and the institutional review board. All the women had low serum estradiol levels (<20 pg/mL) and elevated serum follicle stimulating hormone levels (>40 MIU/mL). Clinical examination and routine biochemical tests were performed to exclude secondary osteoporosis inclusion criteria which were: no previous osteoporotic fracture, at least 2 years of amenorrhea, and no previous HRT or any kind of antiosteoporotic medications. Women with liver or renal disease or endocrine or metabolic abnormalities and/or receiving any medicine known to influence bone mineralization, a history of cancer of the endometrium, liver, or breast; surgical

menopause; and a risk of cardiovascular disease were excluded. All patients received 0.625 mg conjugated estrogen/2.5 mg and medroxyprogesterone for 18 months. BMD was measured at the lumbar spine (L2-4) and the femoral neck using dual X-ray absorptiometry (DXA) both initially and after 18th months of treatment. The coefficient of variation in percent (CV%) from duplicate measurements in healthy volunteers was 1% at the lumbar spine and 1.4% at the femoral neck.

Genomic DNA was extracted from samples of peripheral venous blood according to standard procedures, and the polymerase chain reaction (PCR) using primers with a mismatched primer that introduced a diallelic restriction site, as previously described,² detected the intronic polymorphism of the *COL1A1* gene. The test discriminates two alleles, S and s, which correspond to the presence of guanine and thymidine, respectively, as the first bases in the Sp1-binding site in the first intron of the gene for *COL1A1*. The reaction mixture of 25 μ L contained 100 ng of genomic DNA, 50 mM potassium chloride, 10 mM TRIS-hydrochloric acid (pH 8.3), 1.5 mM magnesium chloride, 0.2 mM dideoxynucleoside triphosphates, 150 ng of each primer, and 0.2 unit of Super Taq DNA polymerase (MBI Fermentas Ltd, Lithuania). The reactions were performed in a DNA thermal cycler Genius (Techne Ltd, USA) with a cycling protocol of 94°C, 60°C, and 72°C for one minute each, for 35 cycles. Ten microliters of PCR product was digested with 2 units of MscI restriction enzyme and 1.2 μ L of a buffer, containing 150 mM TRIS-hydrochloric acid (pH 7.5), 250 mM sodium chloride, and 35 mM magnesium chloride, by incubation for 16 h at 37°C. The digestion products underwent electrophoresis on a 3% NuSieve agarose gel (FMC Bio Products, Rockland, ME, USA) in 44.5 mM TRIS, 44.5 mM boric acid, and 1 mM disodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for 300 volt-hours. The separation patterns were documented by thermal printer (Mitsubishi Ltd, Japan) under ultraviolet illumination (302 nm). *COL1A1* Sp1 binding site polymorphism was studied using the PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) method and the examiners were unaware of the results. The BMD measurements were grouped into SS and Ss groups at the end of the study. Differences in demographic variables between *COL1A1* genotypes were initially compared using parametric and non-parametric tests where applicable. A *P*-value < 0.05 was accepted as significant.

Table 1 Baseline characteristics of the study group according to the COL1A1 genotype (Mean \pm SD)

COL1A1 genotypes	SS (<i>n</i> = 79)	Ss (<i>n</i> = 30)	ss (<i>n</i> = 2)
Age (years)	54.3 \pm 4.4	49.4 \pm 3.33	48.6 \pm 3.0
BMI (kg/m ²)	25.2 \pm 1.6	25.6 \pm 1.3	24.3 \pm 1.4
Time since menopause (months)	28.4 \pm 4.2	30.9 \pm 3.7	30.5 \pm 3.5
FSH (IU/L)	62.9 \pm 13.4	68.0 \pm 11.7	68.0 \pm 11.7
E ₂ (pmol/L)	27.2 \pm 1.9	26.1 \pm 1.7	25.2 \pm 1.8
Parity (number)	2.0 \pm 0.4	2.1 \pm 0.4	2.0 \pm 0.2
Smoking history (n)	5	3	2
Women taking Ca supplementation (%)	44.4	48.1	45.6

Results

The demographic data are given in Table 1. Complete clinical and genotype data were obtained from 111 postmenopausal women. The mean age was 52.7 ± 3 years. Genotype distributions in the 111 women's demographic characteristics are also shown in Table 1. Seventy-nine (71.2%) were homozygous for SS, 30 (27.0%) were heterozygous carrying Ss and two (1.8%) were homozygous for ss. No significant differences were obtained between the COL1A1 genotype groups in terms of age, months since menopause, weight, height, baseline BMD at the femoral neck and the lumbar spine. All patients were osteopenic with a T score of <2.5 SD. Relevant clinical details at the baseline in relation to the COL1A1 genotype are shown in Table 1 and Figure 1. The spinal and femoral necks BMD were lower in the Ss group compared to the SS group, however the decrease was not statistically significant, possibly reflecting the small number of subjects ($P < 0.05$). Following the HRT treatment, the spine BMD increased in both genotype groups, however the response of the spine BMD was not identical in both groups. The increase in BMD was higher in the SS groups compared to the Ss ($3.1 \pm 0.3\%$ vs $1.8 \pm 0.2\%$ $P < 0.05$; Fig. 1). Interestingly, HRT seemed to be less effective in Ss group and only caused some positive changes in lumbar spine compared to the baseline at the 18th month. (Table 2) Femoral neck BMD changes displayed a similar trend as in the lumbar spine although less effectively ($3.1 \pm 0.3\%$ and $1.8 \pm 0.2\%$ vs $2.0 \pm 0.3\%$ and $1.1 \pm 0.1\%$, respectively) (Table 2). Low-dose HRT caused an increase in the femoral neck BMD in both genotypes but the increase was significantly higher in the SS group compared to the Ss group ($2.0 \pm 0.3\%$ vs $1.1 \pm 0.1\%$ $P < 0.05$). Although the patients with the ss genotype were few, all parameters

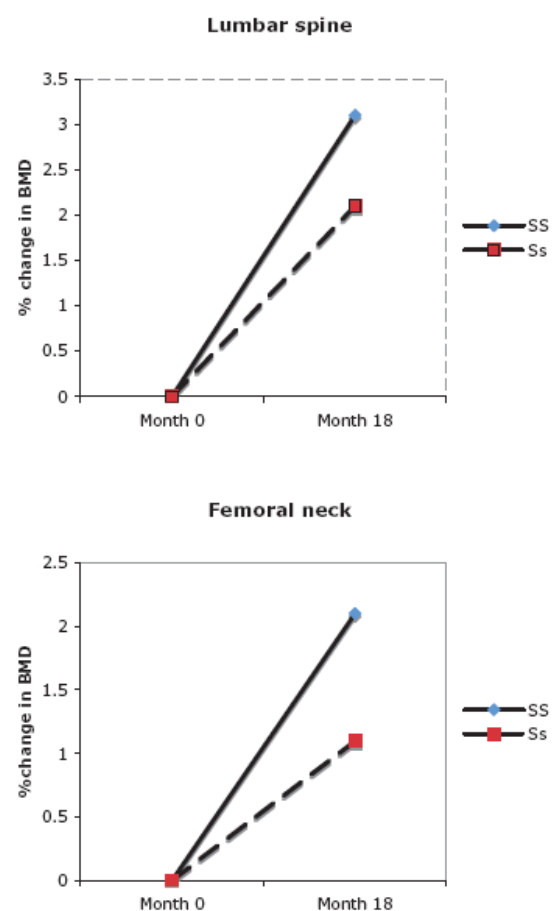


Figure 1 Mean percentage changes in bone mineral density (BMD) in the Lumbar spine and the femoral neck according to COL1A1 genotypes, except the ss genotype.

Table 2 Bone mineral density (BMD) measurements by dual X-ray absorptiometry (DXA) at baseline and after 18 months of hormone replacement therapy (HRT) according to the COL1A1 polymorphism (Mean \pm SD)

		COL1A1 Genotypes		
		SS	Ss	ss
BMD Lumbar spine (g/cm ²)	Baseline	0.869 \pm 0.081	0.839 \pm 0.077	0.822 \pm 0.066
	18th month	0.896 \pm 0.051	0.854 \pm 0.039	0.815 \pm 0.043
	Change (%)	3.1 \pm 0.3*	1.8 \pm 0.2	-0.85
BMD Femur neck (g/cm ²)	Baseline	0.710 \pm 0.73	0.685 \pm 0.083	0.667 \pm 0.054
	18th month	0.724 \pm 0.046	0.692 \pm 0.031	0.645 \pm 0.043
	Change (%)	2.0 \pm 0.3*	1.1 \pm 0.1	-3.29

**P* < 0.05. Change (%) in BMD is significantly different in the SS genotype compared to other genotypes. BMD, bone mineral density.

were lower than the patients with the SS and Ss genotypes. Depending on the COL1A1 genotype, the mean BMD rose comparably in SS homozygotes during the treatment period, however the increase was negligibly small in the Ss group in both the lumbar and femoral neck (1.8 \pm 0.2% vs 1.1 \pm 0.1%, respectively; Fig. 1).

Discussion

One of the most important candidate genes for predisposition to osteoporosis is the COL1A1 gene, which encodes the 1(I) protein chain of type I collagen, the major protein of bone. It is previously identified as a single nucleotide G T polymorphism affecting a binding site for the transcription factor Sp1 in the COL1A1 gene.⁷⁻¹⁵ This polymorphism has been associated with low BMD and an increased risk of osteoporotic fracture in several studies. However, other investigators have found no association between COL1A1 genotypes and BMD or osteoporotic fractures.^{14,16-19} It is clear that osteoporosis and related fractures are important social problems affecting quality of life significantly. The treatments are more costly than the prevention. Although estrogen deficiency is the major contributor to postmenopausal osteoporosis, many confounding factors are relevant including genetics. Various treatment modalities including HRT and bisphosphonates are used in the prevention and treatment of osteoporosis with great variations in efficacy. Following the Women's Health Initiative (WHI) findings, an increased trend was observed in the use of bisphosphonates, however cost and long-term efficacy remains a problem in the era of WHI proceedings.²⁰ It has been demonstrated that COL1A1 Sp1 alleles are determinants of bone mass and bone quality.³ Thus, this polymorphism is associated with low BMD and fracture risk. Keen *et al.* have clearly shown that in the population studied, COL1A1 poly-

morphism determined the osteoporotic risk confirming the original findings by Grant *et al.*² Moreover, studies in two different populations in Denmark and the Netherlands have revealed similar results confirming the role of the 's' allele in fracture risk. Our results are consistent with the above studies, showing reductions in BMD between the COL1A1 genotypes, although not significant. However, this may be a reflection of subject size, which necessitates further trials. Recently, a meta-analysis of 26 studies confirmed the association of the T allele of the Sp1 polymorphism with a modest reduction in BMD and a significant risk of osteoporotic fracture.²¹ Since poor response is always observed in antiosteoporotic treatments, a tool identifying this subgroup may reduce the cost and help to choose the appropriate regimens. Prediction of treatment response will have the potential advantages in terms of cost and clinical outcome. Qureshi *et al.* have reported that COL1A1 Sp1 polymorphism predicts a response to cyclical etidronate therapy.²⁰ Furthermore, recent work has shown that osteoblasts cultured from patients with 's' alleles produced an abnormal increase in the ratio of alpha1 and alpha 2 chains. This impaired osteoblast function may support the above findings of Qureshi *et al.*²⁰ Moreover, although not placebo controlled, our study demonstrated a reduced response to low-dose HRT in Ss genotypes compared to SS subjects. In regards to Qureshi *et al.*'s findings, however, we observed significantly less increase in both the lumbar spinal and femoral neck BMD in Ss heterozygotes. The above findings further support that effectiveness and the appropriate use of antiosteoporotic regimens are closely related to the COL1A1 genotypes of the aimed patient population. Whatever the underlying mechanism is, the above preliminary findings have potential clinical implications in identifying a subgroup of patients that may respond poorly to different regimens.

In conclusion, it has been shown that osteoporotic fractures were strongly associated with the *COL1A1* s allele. Our Preliminary data supports that *COL1A1* s allele is associated with lower BMD compared to normal women. Furthermore, HRT had a lower increase in BMD scores following 18 months of treatment in *COL1A1* s allele individuals compared with normal SS individuals. Our study therefore may provide evidence that the Sp1 polymorphism may ameliorate the effects of HRT on BMD. Thus, we suggest that some additional regimens may be used to support the bone strength and decrease the osteoporotic fractures on this occasion. Moreover, *COL1A1* genotyping may be of clinical value in targeting different regimens to those most likely to respond with potential benefits in terms of cost effectiveness.

Acknowledgment

This study was supported by Akdeniz University Research Foundation.

References

1. Stewart TL, Ralston SH. Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *J Endocrinol* 2000; **166**: 235–245.
2. Grant SFA, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat Genet* 1996; **14**: 203–205.
3. Alvarez L, Oriola J, Jo J *et al.* Collagen type I alpha1 gene Sp1 polymorphism in premenopausal women with primary osteoporosis: improved detection of Sp1 binding site polymorphism in the collagen type 1 gene. *Clin Chem* 1999; **45**: 904–906.
4. Keen RW, Woodford-Richens KL, Grant SFA, Ralston SH, Lanchbury JS, Spector TD. Association of polymorphism at the type I collagen (*COL1A1*) locus with reduced bone mineral density, increased fracture risk, and increased collagen turnover. *Arthritis Rheum* 1999; **42**: 285–290.
5. Roux C, Dougados M, Abel L, Mercier G, Lucotte G. Association of a polymorphism in the collagen I 1 gene with osteoporosis in French women. *Arthritis Rheum* 1998; **41**: 187–188.
6. Gambero P, Borel O, Grant SFA, Ralston SH, Delmas PD. Collagen I 1 polymorphism, bone mass and bone turnover in healthy French pre-menopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 1998; **13**: 813–818.
7. Hampson G, Evans C, Pettit RJ *et al.* Bone mineral density, collagen type 1 alpha 1 genotypes and bone turnover in premenopausal women with diabetes mellitus. *Diabetologia* 1998; **41**: 1314–1320.
8. Byers PH. Brittle bones—fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression. *Trends Genet* 1990; **6**: 293–300.
9. Mann V, Hobson EE, Li B *et al.* A *COL1A1* Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest* 2001; **107**: 899–907.
10. Langdahl BL, Ralston SH, Grant SFA, Eriksen EF. A Sp1 binding site polymorphism in the *COL1A1* gene predicts osteoporotic fractures in men and women. *J Bone Miner Res* 1998; **13**: 1384–1389.
11. Weichetova M, Stepan JJ, Michalska D *et al.* *COL1A1* polymorphism contributes to bone mineral density to assess prevalent wrist fractures. *Bone* 2000; **26**: 287–290.
12. McGuigan FE, Reid DM, Ralston SH. Susceptibility to osteoporotic fracture is determined by allelic variation at the Sp1 site, rather than other polymorphic sites, at the *COL1A1* locus. *Osteoporos Int* 2000; **11**: 338–343.
13. Sowers M, Willing M, Burns T *et al.* Genetic markers, bone mineral density and serum osteocalcin levels. *J Bone Miner Res* 1999; **14**: 1411–1419.
14. Hustmyer FG, Lui G, Johnston CC, Christian J, Peacock M. Polymorphism at an Sp1 binding site of *COL1A1* and bone mineral density in pre-menopausal female twins and elderly fracture patients. *Osteoporos Int* 1999; **9**: 346–350.
15. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q *et al.* Relation of alleles of the collagen type I 1 gene to bone density and risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1998; **338**: 1016–1022.
16. Zajickova K, Zofkova I, Hill M. Is the Sp1 polymorphism in the *COL1A1* gene a risk factor for postmenopausal osteoporosis? Comment on the article by Keen *et al.* *Arthritis Rheum* 2002; **46**: 2828–2829.
17. Liden M, Wilen B, Ljunghall S, Melhus H. Polymorphism at the Sp 1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene does not predict bone mineral density in postmenopausal women in Sweden. *Calcif Tissue Int* 1998; **63**: 293–295.
18. Heegaard A, Jorgensen HL, Vestergaard AW, Hassager C, Ralston SH. Lack of influence of collagen type I alpha1 Sp1 binding site polymorphism on the rate of bone loss in a cohort of postmenopausal Danish women followed for 18 years. *Calcif Tissue Int* 2000; **66**: 409–413.
19. Pedersen AT, Ottesen B. Issues to debate on the Women's Health Initiative (WHI) study. Epidemiology or randomized clinical trials – time out for hormone replacement therapy studies? *Hum Reprod* 2003; **18**: 2241–2244.
20. Qureshi AM, Herd RJ, Blake GM, Fogelman I, Ralston SH. *COL1A1* Sp1 polymorphism predicts response of femoral neck bone density to cyclical etidronate therapy. *Calcif Tissue Int* 2002; **70**: 158–163.
21. Mann V, Ralston SH. Meta-analysis of *COL1A1* Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture. *Bone* 2003; **32**: 711–717.