



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**MALİGN MELANOMA OLGULARINDA EGFR, TP53
P16 VE MDM2 GENLERİNİN FISH İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**TEZ TİPİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TOLGA TÖRE

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. BEYHAN DURAK ARAS**

NİSAN 2018



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**MALİGN MELANOMA OLGULARINDA EGFR, TP53,
P16 VE MDM2 GENLERİNİN FISH İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**TEZ TİPİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TOLGA TÖRE

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. BEYHAN DURAK ARAS**

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tolga TÖRE 'nin Yüksek Lisans olarak hazırladığı “**Malign Melanoma Olgularında EGFR, TP53, P16 VE MDM2 Genlerinin FISH İle Değerlendirilmesi**” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek “**KABUL**” edilmiştir.

20.04.2018

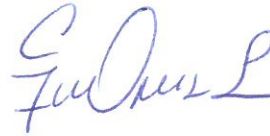
Üye : Prof. Dr. Sevilhan ARTAN



Üye : Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS (Danışman)



Üye : Dr.Öğr.Üy. Onur EROĞLU



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27.04.2018 tarih ve 1169/15759 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü



Özet

Malign melanom, melanin üretmekle sorumlu olan melanositlerin değişimi ile meydana gelen kanser türüdür. Mortalite oranı yüksek olan malign melanomun her yıl insidansında artış olacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada, malign melanom olgularında EGFR, P16, TP53 ve MDM2 gen bölgelerine ait aberasyonların FISH yöntemi ile ortaya konulması amaçlanmıştır.

Histopatolojik olarak tanı almış 16 malign melanom ve 24 melanositik nevüs olgusu çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta ve kontrollere ait deparafinize edilmiş doku preparatlarında FISH yöntemi kullanılarak EGFR, TP53, P16 ve MDM2 bölgelerine ait kopya sayısı değişiklikleri incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre 16 malign melanom olgusunun 7'sinde (%43,75) en az 1 aberasyon, 4'ünde en az 2 aberasyon gözlenmiştir. Yirmidört melanositik nevüs olgusunun 4'ünde (%17) aberasyon saptanmıştır.

Malign melanom olgularında en sık gözlenen anomali EGFR gen amplifikasyonu (%43,75) olarak saptanmıştır. Malign melanom ve melanositik nevüs arasında EGFR amplifikasyonu açısından anlamlı bir fark bulunmuştur. Malign melanom olgularında araştırmış olduğumuz gen kopya sayısı anomalileri (EGFR amplifikasyonu, MDM2 amplifikasyonu, TP53 delesyonu, P16 delesyonu) ile histopatolojik özellikler (ülser, lenf infiltrasyonu, büyüme tipi) ve kanser tipi arasında bir ilişki gözlenmemiştir. Ancak malign melanomlarda EGFR ve MDM2 genlerinin koamplifikasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ve orta düzeyde bir uyum bulunmuştur. Ayrıca TP53 gen delesyonu ile MDM2 gen amplifikasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ve orta düzeyde bir uyum bulunmuştur. Çalışmamız sonucunda melanom ve nevüs tanısı ayırımında EGFR gen amplifikasyonunun kullanılabilir olabileceği ve MDM2 geni ile EGFR geni arasında bulunan uyumun moleküler düzeyde de araştırılarak tümör oluşum ve gelişimi hakkında yeni ipuçları elde edilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Malign melanom, EGFR, TP53, MDM2, P16, FISH

Summary

Malignant melanoma is a type of cancer that occurs with the change of melanocytes which are responsible for producing melanin. The incidence of malignant melanoma with high mortality rate is thought to increase every year. The aim of this study is to determine the aberrations of EGFR, P16, TP53 and MDM2 gene regions in malignant melanoma cases by FISH method.

Histopathologically diagnosed 16 malignant melanomas and 24 melanocytic nevi cases were included in the study. The number of copies of EGFR, TP53, P16 and MDM2 regions were examined by FISH analyses in deparaffinized tissue preparations of patients and controls.

As a results, out of 16 malign melanoma cases, 7 cases (43,75%) had at least 1 aberration, 4 caeses had at least 2 aberrations. Aberrations were observed in 4 of 24 (17%) melanocytic nevus cases.

In conclusion; the most common anomaly in malignant melanoma cases were found to be EGFR gene amplifications (43,75%). A significant difference was found in terms of EGFR amplification between malignant melanoma and melanocytic nevus. No significant correlation was found between the number of gene copy number anomalies (EGFR amplification, MDM2 amplification, TP53 deletion, P16 deletion) or histopathologic features (ulcer, lymph infiltration, growth type) and cancer type in malign melanoma cases. However, there was a statistically significant and moderate correlation between the co-amplification of EGFR and MDM2 genes in malignant melanomas. In addition to this, a statistically significant and moderate correlation between the TP53 gene deletion and MDM2 gene amplification was found. As a result of our study, it is thought that EGFR gene amplifications can be used in differential diagnosis of melanoma and nevus, and the correlation of EGFR and MDM2 genes that we found can give a hint about the tumor formation and development if it'll be investigated with molecular analyses.

Key words: Malignant melanoma, EGFR, TP53, MDM2, P16, FISH

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	III
SUMMARY.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TABLolar DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1- GİRİŞ ve AMAÇ	1
2- GENEL BİLGİLER.....	2
2.1- Kanser	2
2.2- Kanser Türleri	2
2.3- Melanositik Proliferasyonlar	3
2.3.1. <i>Malign Melanom</i>	5
2.4- Melanomda genetik değişimler	7
2.4.1. <i>EGFR ve melanom</i>	7
2.4.2. <i>TP53 ve melanom</i>	9
2.4.3. <i>MDM2 ve melanom</i>	10
2.4.4. <i>P16 ve melanom</i>	11
3- GEREÇ VE YÖNTEM	12
3.1- Gereç	12
3.1.1. <i>Araştırma grubu bireyleri</i>	12
3.1.2. <i>Kullanılan araçlar</i>	12
3.1.3. <i>Kullanılan cam malzemeler</i>	12
3.1.4. <i>Kullanılan kimyasal maddeler</i>	12
3.1.5 <i>Kullanılan problemler</i>	13
3.2- Yöntem	13
3.2.1. <i>Materyel alımı</i>	13
3.2.2. <i>FISH analizi</i>	13
3.2.2.1. <i>FISH tekniğinin uygulanması</i>	13
3.2.2.1.1. <i>Preperatların ön yıkanması</i>	13
3.2.2.1.2. <i>Denatürasyon ve Hibrizasyon</i>	13
3.2.2.1.3. <i>Hibrizasyon sonrası yıkamalar</i>	14

3.2.2.1.4. Hibrize olan bölgelerin görünür kılınması.....	14
3.2.2.1.5. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi.....	14
3.2.2.1.6. Değerlendirme.....	14
3.2.2.1.7. Kullanılan stok solüsyonlar	15
3.3- İstatistiksel Değerlendirme	16
4- BULGULAR	17
4.1- FISH Analiz Sonuçları.....	17
4.1.1. EGFR geni için FISH sonuçları	22
4.1.2. TP53 gen bölgesi için FISH sonuçları.....	22
4.1.3. P16 gen bölgesi için FISH sonuçları	23
4.1.4. MDM2 gen bölgesi için FISH sonuçlar.....	23
4.2- İstatistiksel Değerlendirme Sonuç	24
5- TARTIŞMA.....	26
5.1- Olgularda FISH ile Bulunan Aberasyonların Değerlendirilmesi	26
5.2- Melanom Olgularında EGFR gen kopya sayısının oranlarının karşılaştırılması.....	29
5.2- Melanom olgularında P16 yeniden düzenlenmesinin oranın karşılaştırılması.....	30
5.3- Melanom olgularında TP53 yeniden düzenlenmesinin oranın karşılaştırılması.....	31
5.4- Melanom olgularında MDM2 kopya sayısının oranlarının karşılaştırılması.....	32
6- SONUÇ VE ÖNERİLER	33
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	34
ÖZGEÇMİŞ.....	38

Tablolar Dizini

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Melanositik nevüslerin sınıflandırılması	4
Tablo 2.2. Malign melanomların sınıflandırılması	5
Tablo 3.1. Carnoy's fiksatif solüsyon.....	15
Tablo3.2. Ön yıkama solüsyonları	15
Tablo3.3. Hibrizasyon sonrası kullanılan solüsyonlar	15
Tablo 3.4. Görüntüleme sistemi solüsyonu	15
Tablo 4.1. Malign melanom olgularına ait yaş, cinsiyet ve tanı bilgileri	18
Tablo 4.2. Melanositik nevüs olgularına ait yaş, cinsiyet ve tanı bilgileri	19
Tablo 4.3. Malign melanom olgularına ait FISH sonuçları.....	20
Tablo 4.4. Melanositik nevüs olgularına ait FISH sonuçları	21
Tablo 4.5. EGFR amplifikasyonun malign melanom ve melanositik nevüs sonuçlarının karşılaştırılması	25

Şekiller Dizini

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Avrupa'da kanser oranları.	5
Şekil 2.2. Türkiye'de belirli merkezlerde 2004 ile 2008 yılları arasında erkek bireylerin malign melanom sıklığı.	6
Şekil 2.3. Türkiye'de belirli merkezlerde 2004 ile 2008 yılları arasında kadın bireylerin malign melanom sıklığı.	6
Şekil 2.4. Tirozin kinaz reseptör yolakları.	7
Şekil 2.5. EGF'nin EGFR reseptörüne bağlanmasıyla başlayan olaylar.	8
Şekil 2.6. Melanomada TP53 tümör süpresör geninin ifadesinin bloklanma mekanizmaları	9
Şekil 2.7. ARF-MDM2-TP53 yolağı	11
Şekil 4.1. Malign melanom olgularına ait FISH sonuçları oranı	20
Şekil 4.2. Melanositik nevüs olgularına ait FISH sonuçları oranı.	21
Şekil 4.3. Melanom örneklerinde EGFR gen bölgesinin amplifikasyonu FISH analiz görüntüsü	22
Şekil 4.4. Melanom örneklerinde TP53 gen bölgesinin delesyonu FISH analiz görüntüsü	23
Şekil 4.5. Melanom örneklerinde P16 gen bölgesinin delesyonu FISH analiz görüntüsü	23
Şekil 4.6. Melanom örneklerinde MDM2 gen bölgesinin amplifikasyonu FISH analiz görüntüsü	24

Simge ve Kısaltmalar Dizini

CEP	Centromere
DAPI	4'6'-diamino-2-fenilindol
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FISH	Florence İn Situ Hybridization
gr	Gram
MDM2	Mouse Double Minute 2
ml	Millilitre
NaCl	Sodium Chloride
NaOH	Sodium Hydroxide
NGF	Neuronal growth factor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet derived growth factor
P16	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
TP53	Tumor protein p53
SSC	Saline-Sodium Citrate
WHO	World Health Organization
μ l	Mikrolitre

1- GİRİŞ ve AMAÇ

Deri kanserleri arasında yer alan malign melanomun sıklığı değişen iklim ve ultraviyole ışınlarına maruz kalma süresinin artması gibi nedenlerle her yıl toplumda görülme oranı artmaktadır. Mortalite oranı yüksek bir hastalıktır. Gelecekte iklim değişiklikleri ile beraber malign melanomaya yakalanma riskinin artacağı tahmin edilmektedir.

Melanositik lezyonlar; melanositik nevüsler ve malign melanom olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Bu iki grupta kendi içerisinde farklı gruplara ayrılır ve bu alt grupların histopatolojik özellikleri farklılık göstermektedir. Fakat bu farklılıklara rağmen sadece histopatolojik yöntemlerle tanı konulması ve lezyonun benign veya malign karakter açısından ayırımının yapılmasının zor olduğu bilinmektedir. Bu yüzden malign melanomda genetik değişikliklerin, tanı konulmasını kolaylaştırılacağı ve hastalığın patolojik etyolojisini açıklayabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, malign melanom olgularında EGFR, P16, TP53 ve MDM2 gen bölgelerine ait aberasyonların FISH yöntemi ile ortaya konulması amaçlanmıştır.

2- GENEL BİLGİLER

Kanser, kalp ve damar hastalıklarından sonra ölüm oranı en fazla olan hastalıktır. Her yıl Dünya'da on iki milyondan fazla kanser görülmekte olup, kanserin sebep olduğu ölümler yedi milyondan fazladır. Her yıl kanser hastalarının oranı artmaktadır. Kanser tanı ve tedavileri için her yıl yapılan çalışma sayısı artmakta ve kanser oluşum mekanizmaları keşfedilmektedir (Işık,2014).

2.1- Kanser

Kanser kelime anlamı olarak, bir organ ya da dokudaki hücrelerin düzensiz çoğalmasıyla beliren kötü ırlardır (Arsav, 2006). Kanser, hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulmasıyla ortaya çıkmaktadır. Bundan dolayı kanser özellikle moleküler ve hücresel düzeyde incelenmesi gereken bir hastalıktır (Cooper & Hausmen, 2006).

Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere doğru tepkiyi göstermek yerine kontrolsüz çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürerek, normal doku ve organları istila etmektedir. Kanser gelişimi birbirini izleyen çok aşamalı bir süreçtir. Genetik değişim sonucunda tek bir hücrenin anormal çoğalmasıyla tümör oluşumu başlar. Tümörün gelişmesi ise kontrolsüz çoğalmanın getirdiği yeni mutasyonlarla meydana gelmektedir. Her mutasyon sonucunda hücreler yeni özellikler kazanmaktadır. Çoğalma hızı, sağkalım, invazyon ve metastaz yeteneği gibi özellikler açısından avantajlı tümör hücre klonları ortaya çıkmaktadır. Bu olaya klonal seçim denir (Cooper & Hausmen, 2006).

2.2- Kanser Türleri

Kanser incelemelerinde en önemli konu tümörün selim veya malin olduğunu ayırt etmektir. Selim tümörler çevredeki dokuya ya da vücudun uzak bölgelerine yayılmadan oluşurlar. Malin tümörler ise hem çevredeki dokuya hem de kan ya da lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine metastaz yaparlar.

Tümörler yerleşim yerine, doku tipine, histolojik yapısına göre üçe ayrılır;

1. Karsinomalar (epitelyum hücrelerinden kaynak alır)
2. Sarkomlar (Kemik, kas ya da konnektif doku gibi mezenşimal dokulardan köken alırlar)
3. Lösemi veya lenfomalar (kan ve immün sistem hücrelerinden gelişir) (Cooper & Hausmen, 2006).

2.3- Melanositik Proliferasyonlar

Deri, vücudumuzun en büyük organıdır. Organizma için koruyucu bir örtü olan deri aynı zamanda çevreye sinyal gönderip, çevreden sinyal alır. Dışarıdan gelen uyarıların algılanmasında görev yapmaktadır (Arsav, 2006).

Melanositler, derinin bazal tabakasında, kıl follükülerinde, skuamoz mukozal membranların çoğunda ve leptomeninkslerde yer alan nöral krest kökenli hücrelerdir. Pigment üretimini sağlarlar (Işık, 2014).

Melanositlerin melanin sentezleyen organellerine melanozom denir. İmmatür melanositlere melanoblast ve melanini fagosite etmiş dermal makrofajlara melanofaj denir (Işık, 2014). Melaninler ikiye ayrılırlar. Elips şeklindeki melanozomlardan yapılan eumelanin, deri ile sacın kahverengi-siyah renginden sorumludur ve küre şeklindeki melanozomlardan yapılan pheomelanin deri ve sacın sarı-kırmızı renginden sorumludur (Erenler, 2010).

Melanositik proliferasyonlar; melanositler, nevüs hücreleri veya melanoma hücrelerinin bir veya daha fazlasının kombinasyonundan oluşmaktadır. Melanositlerin benign tümörleri genellikle melanositik nevüs olarak adlandırılırken, malign tümörleri melanom olarak adlandırılırlar (Anlar,2012).

Melanositik nevüsleri sınıflandırılması tablo 2.1'de (Anlar,2012) ve malign melanom sınıflandırılması tablo 2.2'de gibi yapılabilir (Boyle & Levin, 2008).

Tablo 2.1. Melanositik nevüslerin sınıflandırılması (Anlar,2012)

Melanositik nevüsler
Sıradan melanositik nevüs
İntradermal
Junctional
Compound
Konjenital melanositik nevüs
Displastik nevüs
Balon hücreli nevüs
Özel yerleşimli nevüs
Akral deri nevüsü
Melanonychia Striata
Genital deri nevüsü
Spitz nevüs
Pigmente İğ Hücreli nevüs
Derin Penetre nevüs
Rekürren nevüs(Psödomelanom)
Halo nevüs
Mavi (Blue) nevüs

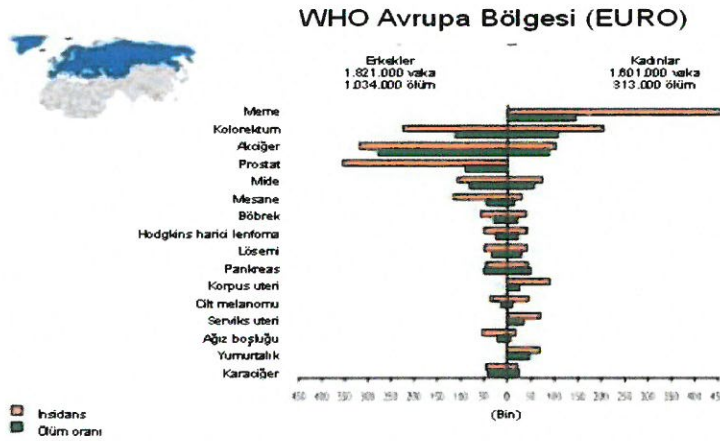
Tablo 2.2. Malign melanomların sınıflandırılması (Boyle & Levin, 2008)

Malign melanom
Süperfisyel yayılan melanom
Nodüler melanom
Lentigo maligna
Akral lentijenöz malign melanom
Blue nevüsten malign melanom
Çocukluk çağı melanom
Dev konjental nevüsten kaynaklanan melanom
Persistan melanom
Desmoplastik melanom

2.3.1. Malign Melanom

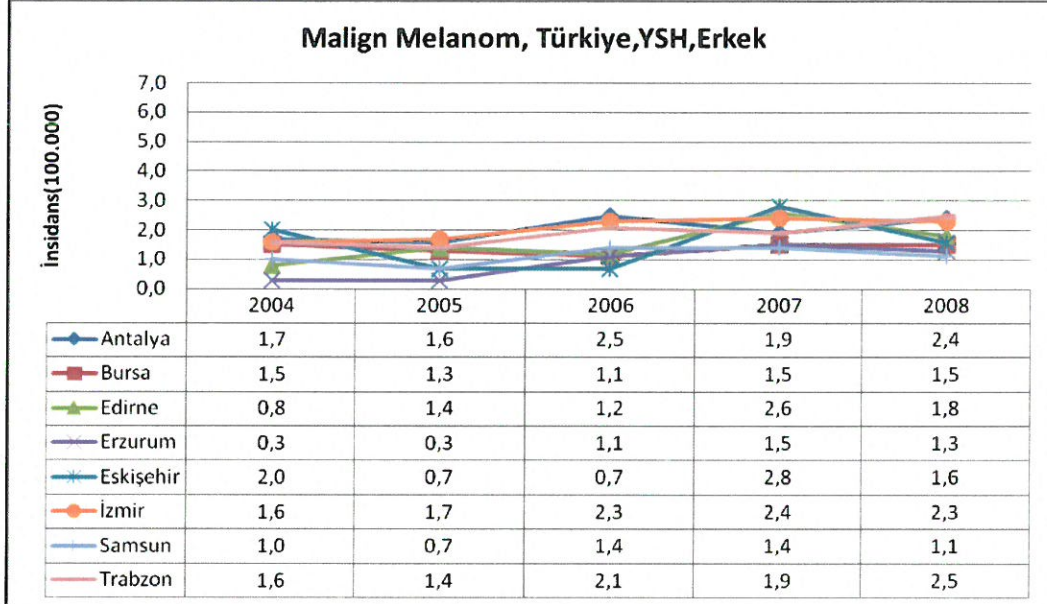
Malign melanom ciltte pigmentasyon yapan melanositlerin malign değişim kazanmasıyla gelişir. Deri dışında skumaoz hücre ile kaplı mükoz membranlarda, gözün uveal tabakasında ve beyinin leptomeninkslerinde de melanom gelişebilir (Erenler, 2010).

Dünya genelinde yeni melanom vakası her yüzbinde 2.8, melanoma bağlı ölümler ise yüzbin kişide 0.6 olarak bildirmektedir. Melanom her yıl insidansında artış gösteren bir hastalıktır. Avrupa'da her yıl altmışikibin yeni vaka saptanmaktadır. Güneş ışığına maruziyetin yüksek olduğu bölgelerde daha sık görülmesi, melanom gelişmesini ultraviyole ışınlarının tetiklediği düşünülmektedir (Çelik vd., 2012). Avrupa Bölgesinin kanser dağılımı Şekil 2.1. de gösterilmiştir.

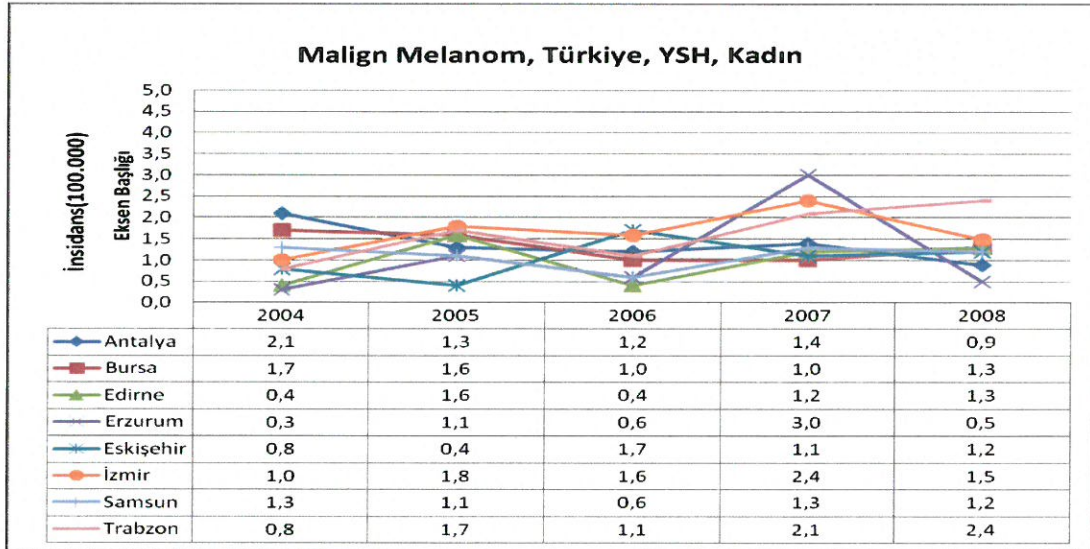


Şekil 2.1. Avrupa'da kanser oranları (Boyle & Levin, 2008).

Türkiye Kanser İstatistikleri (2008 yılına ait) verilerine göre ülkemizde melanom görülme sıklığı; erkeklerde yüzde 1.9, kadınlarda yüzde 1.3'dür. Türkiye'nin 2004'ten 2008 yılına kadar melanom hasta oranları şekil 2.2. (Erkek) ve şekil 2.3. (Kadın) gösterilmiştir (Çelik vd., 2012) .



Şekil 2.2. Türkiye'de belirli merkezlerde 2004 ile 2008 yılları arasında erkek bireylerin malign melanom sıklığı (Çelik vd., 2012).

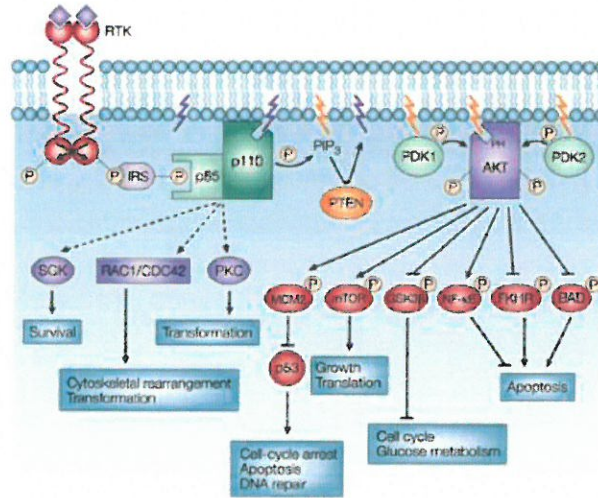


Şekil 2.3. Türkiye'de belirli merkezlerde 2004 ile 2008 yılları arasında kadın bireylerin malign melanom sıklığı (Çelik vd., 2012).

2.4- Melanomda genetik değişimler

Melanom patogenezi komplekstir ve tam olarak anlaşılmamıştır. Bununla birlikte çevresel faktörlerle etkileşim (Ultraviyole ışınlar maruziyet gibi), genetik değişimlerin birikimi ve onkogenlerin aktivasyonu patogeneizde rol oynamaktadır (Rigel, 2010).

Genomdaki genlerimizin yüzde yirmisi sinyal iletiminde görev almaktadır. Protein kinazlar membran yerleşimli ve sitoplazmik tirozin kinaz olmak üzere ikiye ayrılır. Protein kinazlar sinyal iletim sırasında protein fosforilasyonu gerçekleştirir ve katalitik özelliklerine göre tirozin ve serin/treonin olarak gruplandırılırlar. Membrana yerleşen proteinlere reseptör tirozin kinaz (RTK) denir (Cooper & Hausmen, 2006). Reseptör tirozin kinazlar substrat proteinleri tirozin kalıntılarından fosforiller. EGF (Epidermal büyüme faktörü), NGF (Nöronal büyüme faktörü), PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktörü), insülin ve bazı büyüme faktörü reseptörleri tirozin kinazlardır. Tirozin kinaz reseptör yolları şekil 2.4'te gösterilmektedir (Sümer-Turanlıgil & Uyanıkgil, 2010). Karsinogenez sürecinde sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi söz konusudur (Cooper & Hausmen, 2006).



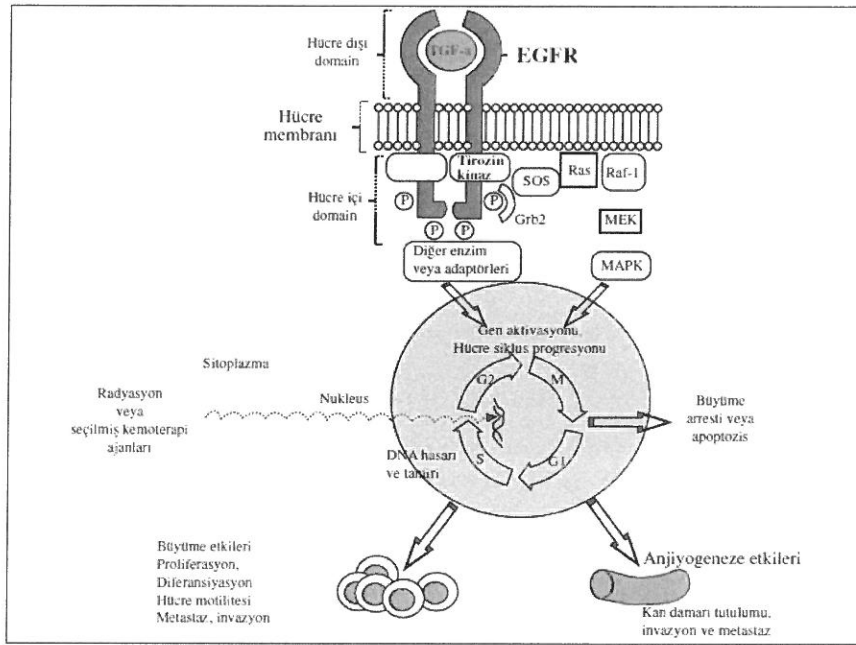
Şekil 2.4. Tirozin kinaz reseptör yolları (Sümer-Turanlıgil & Uyanıkgil, 2010).

2.4.1. EGFR ve melanom

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) geni, protein kinaz üst ailesini kodlayan gen ailesi içerisinde yer alır (Groeger et al., 1997). EGFR, 7p12 kromozomal bölgesinde yer alır ve yüz yetmiş kDa'luk transmembran tirozin kinaz reseptörünü kodlar (Köktürk, Öztürk, & Kırışoğlu, 2003). Kodlanan reseptör üç bölgeden oluşmaktadır;

1. N terminali; Hücre dışı ligandların bağlandığı bölge
2. Hidrofobik transmembran bölgesi
3. C terminali; Hücre içi yerleşimli tirozin kinaz aktivitesi(Boone et al., 2011).

Reseptörün N ucunda EGF (epidermal growth factor) ve TGF- α (transforming growth factor- α) otoposforilasyon başlayarak tirozin kinaz aktivasyonu sağlanır. Bu aktivasyonla sinyal iletimi, hücre proliferasyonu ve tümör progresyonunda rol alan önemli olaylar başlar. EGF'nin EGFR reseptörüne bağlanmasıyla ortaya çıkan değişiklikler şekil 2.5'te gösterilmektedir(Köktürk et al., 2003).



Şekil 2.5. EGF'nin EGFR reseptörüne bağlanmasıyla başlayan olaylar(Köktürk et al., 2003).

Bir çok neoplazmada EGFR proteinin fazladan ifadesi tümör gelişimiyle ve kötü prognozla ilişkilidir (Sequist, Bell, Lynch, & Haber, 2007). Genetik açıdan incelendiğinde EGFR gen amplifikasyonları ve mutasyonları karsinogenezde önemli rol oynadığı ortaya konmuştur (Rákosy et al., 2007).

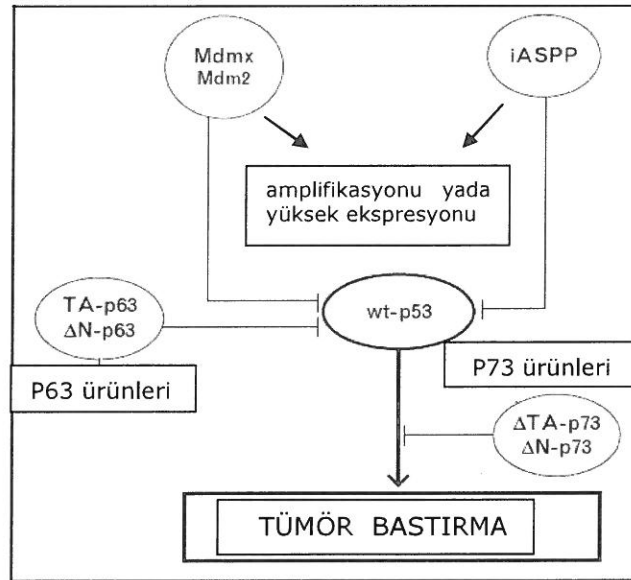
Malign melanomalarda yapılan EGFR çalışmalarında; EGFR geninin mutasyonu saptanmamışken, FISH yöntemiyle EGFR gen amplifikasyonu ve polizomisi bulunmuştur. Bu aberasyonların, malign melanomada tümör kalınlığı ve ülserasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Boone et al., 2011).

2.4.2. TP53 ve melanom

TP53 geni kromozom 17p13'de yer almaktadır. TP53 geninin ürünü, hücre döngüsünün engellenmesi, DNA hasarının kavranması ve apoptozisin uyarılmasında rol oynar. TP53 geni tümör süpresör bir genidir (Cooper & Hausman, 2006). Karsinogenezde önemli role sahip olduğu bilinen TP53 yolağının inaktivasyonunun tüm kanser türlerinde etkili olduğu bilinmektedir (Vogelstein, Lane, & Levine, 2000).

TP53 geninin delesyon ya da mutasyonu tüm kanser çeşitlerinde gözükmez. Özellikle malign melanomlarda TP53 delesyon ya da mutasyonu çok ender gözükmemektedir (Freedman, Wu, & Levine, 1999). Chin ve arkadaşları malign melanom gelişiminde TP53 geninin etkisini göstermeyi amaçlayarak, mutant fareler ile gerçekleştirdikleri çalışmada melanom oluşması için TP53 fonksiyonel kaybının olması gerektiğini açıkça göstermişlerdir (Chin, Garraway, & Fisher, 2006).

Melanomlarda TP53 fonksiyonel inaktivasyonunu üç mekanizmayla açıklanabilir. Birincisi MDMX ve MDM2 genlerinin amplifikasyonu ya da yüksek ekspresyonudur. İkincisi TP53 gen ailesinde olan P63 ve P73 genlerinin ürünlerinin fazla ekspresyonudur. Özellikle P63 geninin isoform ürünlerinin ekspresyonu TP53 gen ifadesini baskılamaktadır. Ancak mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Üçüncüsü; TP53 inhibitörü olan proapoptotik iASPP'ın (Apoptosis stimulating protein of TP53) genleri melanom örneklerinde yüksek ekspresyonudur. Şekil 2.6'ta TP53 geninin ifadesinin bloklanması gösterilmektedir (Freedman et al., 1999).



Şekil 2.6. Melanomada TP53 tümör süpresör geninin ifadesinin bloklanma mekanizmaları (Freedman, Wu, & Levine, 1999'dan değiştirilerek alınmıştır.)

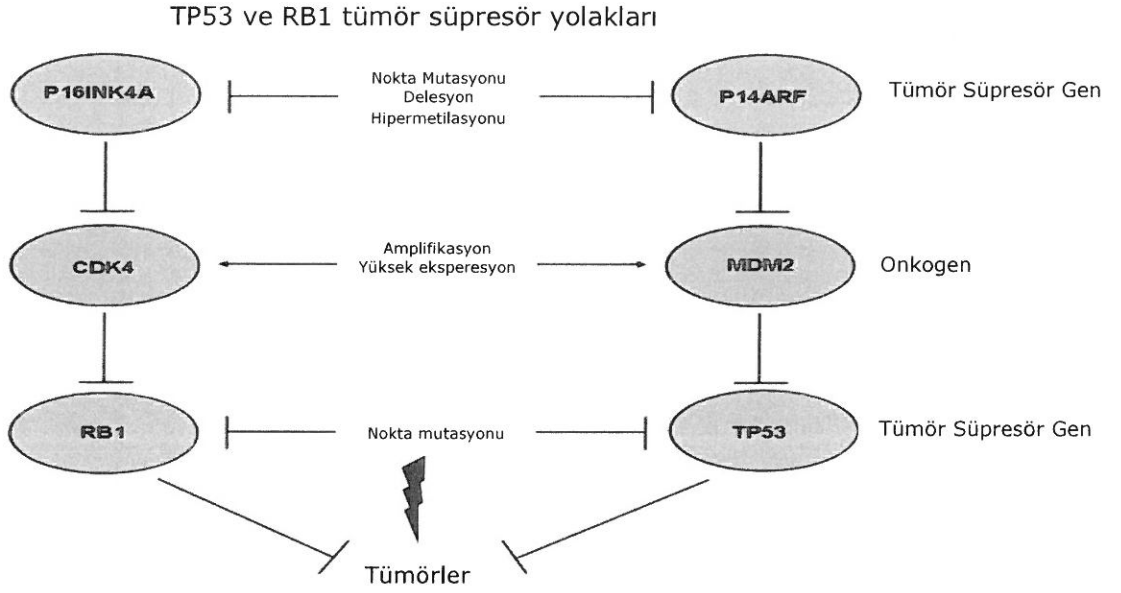
2.4.3. MDM2 ve melanom

MDM2 geni kromozom 12q14'te yer almaktadır. Fare hücre hatlarındaki "double minute" (sentromer olmayan küçük kromatin parçacıkları) kromozomlarında tanımlanmıştır. MDM2 geni tümör oluşumuna neden olduğundan 1991 yılında onkogen olarak tanımlanmıştır (Eren, 2006).

MDM2 geninin görevi TP53 proteinin fonksiyonlarını düzenlemektir. Normal hücrelerde TP53 ve MDM2 gen ürünleri dengede sentezlenmektedir (Shieh, Ikeda, Taya, & Prives, 1997). MDM2 ve MDMX proteinleri embriyonik gelişim boyunca gerekli olan TP53 inhibitörleri olup, bu genlerin ekspresyonu TP53 tümör supressörün etkisini zayıflatır (Wade, Li, & Wahl, 2013).

TP53 ve MDM2 arasındaki etkileşimi inhibe eden modifikasyonlar; TP53'ün fosforilasyonu, MDM2'nin fosforilasyonu ve MDM2 fonksiyonunun P14ARF proteini ile engellenmesidir (Shieh et al., 1997). TP53 fosforilasyonu, TP53'ün DNA bağımlı protein kinaz (DNA-PK) tarafından 25. serin amino asitinden fosforile edildiği ve bu nedenle MDM2'nin TP53 ile bağlanamadığı bulunmuştur. Ayrıca iyonize edici radyasyon sonucunda da TP53 fosforilasyonu gerçekleşebilir (Hay & Meek, 2000). MDM2'nin fosforilasyonu sonucu, MDM2'nin iki önemli fonksiyonel bölgesi olan TP53 bağlanma ve ubiquitinasyondan sorumlu bölgelerinde fosforilasyon olur (Mayo, Turchi, & Berberich, 1997). MDM2 çift zincirli DNA bağımlı protein kinaz (DNA-PK) tarafından 17. serin aminoasitinden fosforile edilir (Pomerantz & Schreiber-agus, 1998). MDM2 fonksiyonunun P14ARF proteini ile engellenmesi, P14ARF geninin ürünü MDM2'ye bağlanarak TP53 ile ilişki kurmasını engeller ve MDM2'nin parçalanmasını da uyarmaktadır (Goldstein et al., 2006).

Yapılan bir çalışmada TP53 fonksiyonel kaybının MDM2 geninin amplifikasyonu sonucunda ortaya çıktığı raporlanmıştır. Ayrıca MDM2 ve CDK4 gen amplifikasyonların melanom üzerindeki etkisini incelerken ARF-MDM2-TP53 yolağının işlevini doğrulamışlardır. Malign melanomlarda görülme sıklığının %3 ila %5 arasında olduğu belirtilmiştir. (Muthusamy et al., 2006). Bu ilişki şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. ARF-MDM2-TP53 yolağı (Muthusamy et al., 2006'dan değiştirilerek alınmıştır.)

2.4.4. P16 ve melanom

P16 geni kromozom 9p21.3'de yer almaktadır. P16 geni kritik tümör baskılayıcı proteinler olan P16^{INK4A} ve P14^{ARF} kodlamaktadır. P16^{INK4A}, siklin bağımlı kinaz inhibitörü, retinoblastoma yolağında etkindir ve CDK4 ile CDK6'yi bağlayarak hücrel çoğalmada rol oynamaktadır. P14^{ARF} ise TP53 aktive eder (Bogdan, Burg, & Böni, 2001). Ayrıca MDM2 fonksiyonu P16 proteinleri ile inhibe edilebilir ve böylelikle P16 genindeki fonksiyonel kayıp, MDM2 ve TP53 yolağında etkili olarak tümör oluşumunda rol oynayabilir (Hodis et al., 2012).

Germline P16 mutasyonları ailesel melanomlarda çok sıktır ve vakaların %40'ını oluşturmaktadır (Bogdan et al., 2001). Yapılan bir diğer çalışmada ise P16'nın kaybı ya da mutasyonun melanomların çoğunda TP53 inaktivasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiş ve vakaların yaklaşık %12'sinde tespit edilmiştir (Nicholson, Gee, & Harper, 2001). Bugüne kadar birçok çalışma da nevüs ve spitz melanositik hücrelerinde P16 delesyonunu FISH yöntemiyle tespit edilebildiği gösterilmiştir (Sini et al., 2008).

3- GEREÇ VE YÖNTEM

3.1- Gereç

3.1.1. Araştırma grubu bireyleri

Çalışmamız 2008 ve 2013 yılları arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı almış kırk olguya ait deparafinize doku kesitleri ile ESOĞÜ Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Örneklerimizden yirmidörtü melanositik nevüs, onaltısı malign melanom olup, EGFR, TP53, P16 ve MDM2 bölgelerinin yeniden düzenlenmesi açısından FISH analizi ile araştırılmıştır. Yaş ortalaması $40,5 \pm 19,4$ olan yirmiyedi kadın ve onüç erkek bireylerin; yaş, tanı ve cinsiyetlerine ilişkin bilgiler tablo 4.1. ile tablo 4.2.'de yer almaktadır.

3.1.2. Kullanılan araçlar

- Elektronik terazi (Seuter, Ainworth-AA-250)
- Deep-Freeze (Heraeus)
- Etüv (Friocell MMM Med Center)
- Vortex (Janke and Kunkel, UF-2)
- pH Metre (Jenco)
- Su banyosu (Nüve)
- Floresan mikroskop (Olympus BX-61)
- Image Analyser (Cytovysion)
- Mikropipet (Eppendorf)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf)
- Kronometre
- Pipet uçları
- HYCHROME (Glia Medikal)

3.1.3. Kullanılan cam malzemeler

- Beher (Beşyüz ml, bin ml)
- Erlenmayer (Beşyüz ml, bin ml)
- Mezür
- Yatay ve dikey şale

3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler

- Etanol (Merck)
- DAPI (Sigma)
- İmmersiyon yağı (Merck)
- $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba)
- NaCl (Merck)
- NaOH (Merck)
- KH_2PO_4 (Merck)

- Methanol (Merck)
- Rubber Cement (Marabu Fixogum)
- VECTASHIELD
- Tween 20 (Sigma)

3.1.5 Kullanılan problemler

- Vysis LSI EGFR SpectrumOrange/Vysis CEP 7 SpectrumGreen Probe (7p11.2-p12/CEP7)(Abbot molekuler)
- P16 (CDKN2A) Deletion (9p21.3/CEP9)(Cytocell)
- SPEC MDM2/CEN 12 (12q15/CEP12) (ZytoVision)
- SPEC TP53/CEN 17 (17p13/CEP17) (ZytoVision)

3.2- Yöntem

Nevüs ve malign melanom örnekleri FISH yöntemi ile analiz edilmiştir.

3.2.1. Materyel alımı

Malign melanom ve melanositik nevüs olgularına ait doku materyali ESOGÜ Patoloji AD.'dan deparafnize edilmiş 4 µ'luk kesitler halinde moleküler sitogenetik laboratuvarımıza ulaştırılmıştır.

3.2.2. FISH analizi

3.2.2.1. FISH tekniğinin uygulanması

FISH tekniğinde Rieder ve arkadaşları tarafından geliştirilen protokol modifiye edilerek uygulanmıştır (Rieder vd., 1998).

3.2.2.1.1. Preparatların ön yıkanması

Preparatlar sırasıyla 2XSSC solüsyonundan ve %70 - %85 - %100'lük alkol serisinden ikişer dakika olmak üzere geçilerek dehidre edilmiştir.

3.2.2.1.2. Denatürasyon ve Hibrizasyon

Proben bulunduğu 1 ml. lik tüpler santrifüj edilerek tüm probun dibine çökmesi sağlanmıştır. Ön yıkaması biten preparatlarda belirlenen alana prob (5 µl) eklenmiş ve yirmidört mm'lik lamel kapatılmıştır. HyChrome hibrizasyon cihazında 75°C'de 10 dakika denatürasyon yapılmıştır. İşlem bittikten sonra preparatlar nemli ortamda onsekiz saat hibridizasyona bırakılmıştır.

3.2.2.1.3. Hibrizasyon sonrası yıkamalar

Hibrizasyonu tamamladıktan sonra, preparatlar alınarak üstündeki lamelleri 2XSSC'de çıkartılmış, 0,4XSSC solüsyonu içerisinde 72°C'de 2 dakika bekletilmişlerdir. Daha sonra 2XSSC/T-20 solüsyonunda kırkbeş saniye bırakılmıştır.

3.2.2.1.4. Hibrize olan bölgelerin görünür kılınması

Hibrizasyon sonrası yıkamaları yapılan preparatlar 4XSSC/DAPI solüsyonunda iki dakika bekletilmiş, süre sonunda 20µl. yüzey boyası (VECTASHIELD) damlatılıp lamel kapatılmıştır. İnceleme aşamasına kadar preparatlar -20°C'de ve karanlıkta bekletilmişlerdir.

3.2.2.1.5. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Preparatlar Olympus BX-61 Floresan mikroskobunda uygun filtrelerle incelenmiştir. Floresan mikroskoba bağlı soğutmalı kamera ve görüntü analiz sistemi aracılığıyla her olguya ilişkin FISH analiz verileri incelenmiş, fotoğraflanmış ve arvişlenmiştir.

3.2.2.1.6. Değerlendirme

Malign melanom ve melanositik nevüs olgularından alınan örnekler FISH yöntemi uygulanmış, tanılarına ilişkin belirlenen bölgelerde en az elli hücre analiz edilmiştir. Kullandığımız problemleri; malign melanom olgularına ait kesitlerde patoloğların belirlediği malign olmayan bölgelerde ve benign dokularda da lezyon dışı bölgelerde analiz edip, ilgili istatistiksel hesaplama sonrası %7-10 olacak şekilde belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucu %10'un üstünde bulunan her farklı sinyal paterni anormali olarak değerlendirilmiştir.

Değerlendirme esnasında her bir gen bölgesi için sinyal sayısı; eğer 2'den az ise delesyon, 4 ve daha fazla ise amplifikasyon olarak kabul edilmiştir.

Hastaların histopatolojik özellikleri ile FISH sonuçları arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmeye alınan histopatolojik özellikler aşağıda belirtilmiştir;

Tümör Kalınlığı (Breslow Kalınlığı): Tümörün üzerinde bulunan epidermis stratum granulosum tabakasının üst kısmından tümörün tabanına kadar olan mesafenin mm cinsinden ölçümüdür.

Clark Level: Kütanöz ve subkütanöz yapılardaki histopatolojik tümör invazyon derinliğini göstermektedir.

Mitoz oranı: Bu oran, on büyük büyütme alanındaki mitoz sayısı veya invaziv tümörün mm²'si başına düşen mitoz sayısı olarak değerlendirilir.

Lenf infiltrasyonu: Melanoma karşı gelişen immün yanıt, vertikal büyüme fazındaki tümörün içinde ve tabanındaki lenfositik infiltrasyon şeklinde kendini gösterir (Anlar,2012).

3.2.2.1.7. Kullanılan stok solüsyonlar

Tablo 3.1. Carnoy's fiksatif solüsyon

Metanol	3 birim
Asetik asit	1 birim

Tablo3.2. Ön yıkama solüsyonları

20XSSC solüsyonu	NaCl (3M)	175,3 gr
	TriSodyum Sitrata	88,24 gr
	Distile su	1000 ml
2XSSC solüsyonu	20XSSC	20 ml
	Distile su	180 ml

Tablo3.3. Hibrizasyon sonrası kullanılan solüsyonlar

0,4XSSC	20XSSC	20 ml
	Distile su	180 ml
2XSSC	20XSSC	4 ml
	Distile su	196 ml
2XSSC/Tween-20 solüsyonu	20XSSC	20 ml
	Distile su	180 ml
	Tween 20	100 µl

Tablo 3.4. Görüntüleme sistemi solüsyonu

DAPI/Antifade solüsyonu	2XSSC	20 ml
	DAPI	100 µl
	Distile su	80 ml

3.3- İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler IBM SPSS 21.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sürekli değişkenlere ait özet değerler ortalama $40,5 \pm 19,4$ ya da medyan (Q_1-Q_3) olarak verilmiştir. Gen bölgelerindeki aberasyonların aralarındaki uyum Kappa analiziyle, kategorik değişkenler arasındaki ilişki Ki-kare testiyle araştırılmıştır. Verilerin normal dağılıma uyumu Shapiro Wilk testiyle araştırılmıştır. Bağımsız grupların karşılaştırılması Mann Whitley U testi ile yapılmıştır. $P < 0,05$ olarak elde edilen sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

4- BULGULAR

Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda, Patoloji Anabilim Dalı'nda tanısı konulmuş melanositik lezyon olgularına ait örnekler çalışarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma grubumuzu; onaltı malign ve yirmidört benign doku örneği oluşturmuştur. Çalışmamızda, malign melanom ve melanositik nevüs olgularında EGFR, P16, TP53 ve MDM2 gen bölgelerindeki aberasyonlar FISH yöntemi ile analiz edilmiştir.

Çalışmamızda yer alan tüm olgularımızın yaş ortalaması $40,5 \pm 19,4$ olup, bir olgumuzun yaş bilgisine ulaşamamıştır. Olgu grubumuz onüç erkek ve yirmiyedi kadından oluşturulmuştur. Aşağıdaki tablo 4.1. ve 4.2.'de olgularımızın yaş, tanı ve cinsiyetlerine ilişkin bilgiler yer almaktadır.

Çalıştığımız tüm olgulardan ellişer hücre analiz edilmiştir.

4.1- FISH Analiz Sonuçları

Elde ettiğimiz sonuçlara göre malign melanom olgularının 7'sinde (%43,75) en az bir aberasyon saptanmıştır. Bir olguda üç aberasyon, üç olguda iki aberasyon görülmüştür. Diğer çalışma grubumuzu oluşturan yirmidört melanositik nevüs olgularından yirmi tanesi normal bulunmuştur. Dört olguda ise en az bir parametre açısından anormal olduğu saptanmıştır.

Malign melanom olgularının FISH sonuçları tablo 4.3.de, melanositik nevüslerin FISH sonuçları tablo 4.4.'de verilmiştir. Malign melanom olgularının FISH sonuçlarının oranları şekil 4.1.'de, melanositik nevüslerin FISH sonuç oranları şekil 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Malign melanom olgularına ait yaş, cinsiyet ve tanı bilgileri

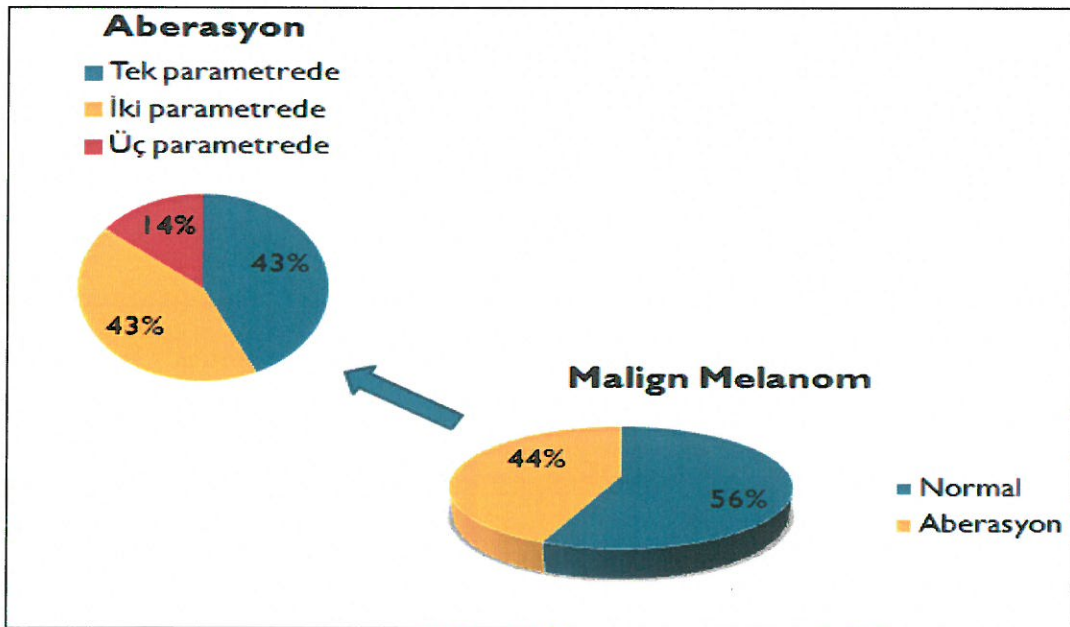
Olgu sayısı	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Altıtipi
1	57	Erkek	Malign melanom	Nodüler tip malign melanom
2	57	Kadın	Malign melanom	-
3	66	Erkek	Malign melanom	Yüzeyel yayılan melanom
4	53	Erkek	Malign melanom	Yüzeyel yayılan melanom
5	51	Kadın	Malign melanom	-
6	77	Kadın	Malign melanom	Lentigo malign melanom
7	61	Kadın	Malign melanom	Akral lentiginöz tip malign melanom
8	61	Kadın	Malign melanom	Yüzeyel yayılan melanom
9	66	Kadın	Malign melanom	Lentigo malign melanom
10	32	Kadın	Malign melanom	-
11	70	Erkek	Malign melanom	-
12	77	Kadın	Malign melanom	Akral lentiginöz tip malign melanom
13	42	Kadın	Malign melanom	Akral lentiginöz tip malign melanom
14	66	Erkek	Malign melanom	Nodüler tip malign melanom
15	-	Kadın	Malign melanom	Nodüler tip malign melanom
16	71	Erkek	Malign melanom	-

Tablo 4.2. Melanositik nevüs olgularına ait yaş, cinsiyet ve tanı bilgileri

Olgu sayısı	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Alttipi
17	16	Kadın	Melanositik nevüs	Spitz nevüs
18	20	Kadın	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
19	33	Kadın	Melanositik nevüs	Kompond nevüs
20	48	Kadın	Melanositik nevüs	Kompond nevüs
21	16	Kadın	Melanositik nevüs	Kompond nevüs
22	34	Erkek	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
23	35	Kadın	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
24	11	Kadın	Melanositik nevüs	Spitz nevüs
25	27	Kadın	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
26	35	Kadın	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
27	28	Erkek	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
28	23	Kadın	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
29	34	Erkek	Melanositik nevüs	Kompond nevüs
30	20	Kadın	Melanositik nevüs	Kompond nevüs
31	14	Kadın	Melanositik nevüs	Spitz nevüs
32	29	Kadın	Melanositik nevüs	Spitz nevüs ile uyumlu junctional nevüs
33	23	Erkek	Melanositik nevüs	Kompond nevüs
34	8	Erkek	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
35	42	Kadın	Melanositik nevüs	İntradermal nevüs
36	35	Kadın	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
37	38	Kadın	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs
38	49	Kadın	Melanositik nevüs	İntradermal nevüs
39	35	Erkek	Melanositik nevüs	İntradermal nevüs
40	20	Erkek	Melanositik nevüs	Displastik kompond nevüs

Tablo 4.3. Malign melanom olgularına ait FISH sonuçları

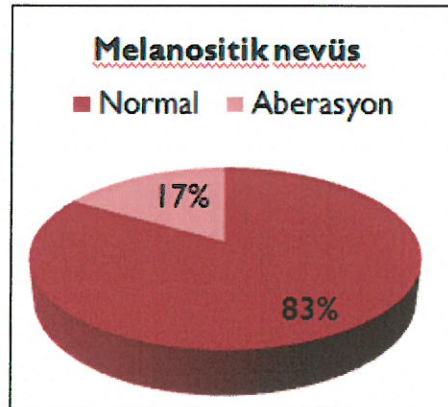
Olgu sıra no	Olgu No	Tanı	EGFR gen amp.	P53 gen delesyon	MDM2 gen amp.	P16 gen delesyon
1	5	MM	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif
2	2	MM	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif
3	3	Yüzeyel yayılan MM	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif
4	10	MM	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif
5	15	MM	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
6	9	Lentigo MM	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
7	13	Akral lentiginöz MM	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
8	12	Akral lentiginöz MM	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
9	1	Nodüler MM	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
10	4	Yüzeyel yayılan MM	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
11	11	MM	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
12	8	Yüzeyel yayılan MM	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
13	16	MM	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif
14	6	Lentigo MM	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
15	14	Nodüler MM	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
16	7	Akral lentiginöz MM	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif



Şekil 4.1. Malign melanom olgularına ait FISH sonuçları oranı

Tablo 4.4. Melanositik nevüs olgularına ait FISH sonuçları

Olgu sıra no	Olgu No	Tanı	EGFR gen amp.	P53 gen delesyon	MDM2 gen amp.	P16 gen delesyon
17	28	Displastik kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
18	34	Displastik kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
19	24	Displastik kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
20	40	Displastik kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
21	27	Displastik kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
22	23	Displastik kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
23	22	Displastik kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
24	17	Spitz nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
25	32	Spitz nevüs ile uyumlu junctional nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
26	20	Kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
27	25	Displastik kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
28	19	Kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
29	29	Kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif
30	35	İnterdermalnevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
31	37	Displastik kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
32	18	Displastik kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
33	33	Displastik kompond nevüs	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
34	26	Displastik kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
35	38	İntradermal nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
36	30	Kompond nevüs	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
37	21	Kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
38	39	İntradermal nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
39	31	Spitz nevüs	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
40	36	Displastik kompond nevüs	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif

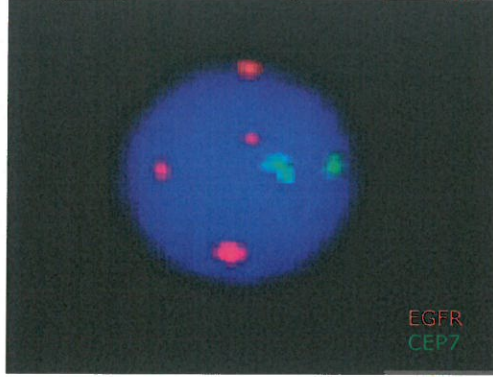


Şekil 4.2. Melanositik nevüs olgularına ait FISH sonuçları oranı

4.1.1. EGFR geni için FISH sonuçları

Çalışmamız sonucunda 16 malign melanom olgusunun 7'si (%43,75) EGFR gen amplifikasyonu açısından pozitif saptanmıştır. Bu olgulardan ikisi akral lentijinöz tip (olgu 7 ve 16), bir olgu yüzeysel yayılan tip melanom (olgu 11) iken geriye kalan dört olgunun alt tipi belirlenmemiştir. Olgu 7 ve 16'da EGFR amplifikasyonunun yanında MDM2 gen amplifikasyonu da gözlenmiştir. Olgu 1'de EGFR amplifikasyonunun yanında P16 delesyonu gözlenmiştir. Olgu 4'te EGFR amplifikasyonunun yanında MDM2 gen amplifikasyonu ve TP53 delesyonu da gözlenmiştir.

Diğer çalışma grubumuz olan 24 melanositik nevüs olgularının tümünün EGFR gen amplifikasyonu açısından normal olduğu gözlenmiştir.

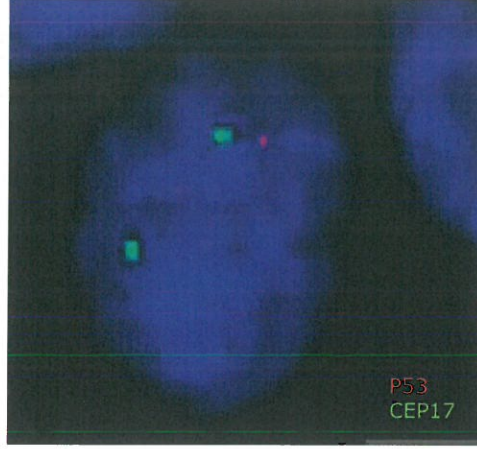


Şekil 4.3. Melanom örneklerinde EGFR gen bölgesinin amplifikasyonu FISH analiz görüntüsü

4.1.2. TP53 gen bölgesi için FISH sonuçları

Malign melanom olgularımızı TP53 gen delesyonu açısından incelediğimizde 1 olguda aberasyon saptadık. Bu olguda TP53 delesyonu EGFR ve MDM2 gen amplifikasyonlarına eşlik etmekteydi.

Diğer çalışma grubumuz olan melanositik nevüs hastaların hiçbirinde TP53 delesyonu gözlenmemiştir.

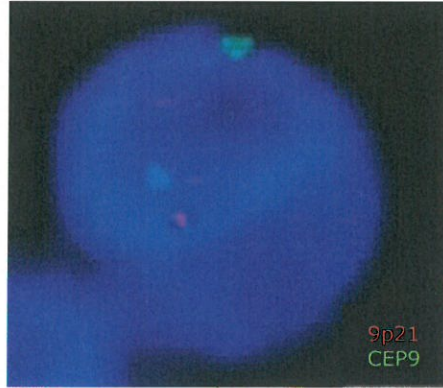


Şekil 4.4. Melanom örneklerinde TP53 gen bölgesinin delesyonu FISH analiz görüntüsü

4.1.3. P16 gen bölgesi için FISH sonuçları

Malign melanom olgularımızı P16 gen delesyonu açısından incelediğimizde 1 olguda aberasyon saptadık. Bu olguda P16 delesyonu EGFR gen amplifikasyonuna eşlik etmekteydi.

Diğer çalışma grubumuz olan melanositik nevüs hastalarında bir olguda P16 delesyonu gözlenmiştir. P16 delesyonu olan hasta kompond nevüs (olgu 29) alt tipindedir.

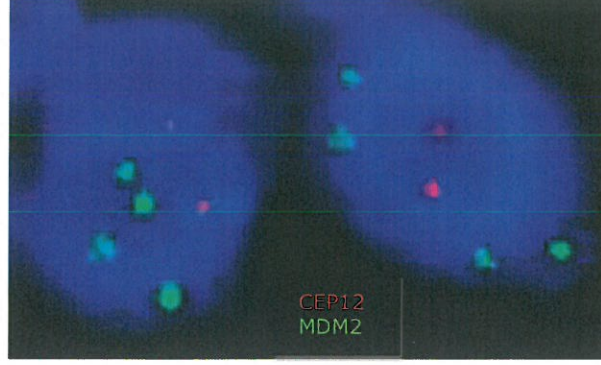


Şekil 4.5. Melanom örneklerinde P16 gen bölgesinin delesyonu FISH analiz görüntüsü

4.1.4. MDM2 gen bölgesi için FISH sonuçlar

Çalışmamız sonucunda 16 malign melanom olgusundan üç olguda (%18,75) MDM2 gen amplifikasyonu pozitif olarak gözlenmiştir. Bu üç olguda da EGFR amplifikasyonu MDM2 amplifikasyonuna eşlik etmekteydi.

Diğer çalışma grubumuz olan melanositik nevüs hastalarının üçünde MDM2 amplifikasyonu saptanmıştır. MDM2 amplifikasyonu pozitif olan hastalar kompuond nevüs (olgu 30), spitz nevüs (olgu 39) ve displastik nevüs (olgu 33) alltipleridir.



Şekil 4.6. Melanom örneklerinde MDM2 gen bölgesinin amplifikasyonu FISH analiz görüntüsü

4.2- İstatistiksel Değerlendirme Sonuç

Çalışmamızın sonucunda saptanan gen bölgelerindeki aberasyonların birbirleriyle ilişkili olup olmadığı Kappa testiyle değerlendirilmiştir. Kappa testi değerlendirmesi sonucunda EGFR gen amplifikasyonun, P16 ve TP53 gen delesyonları ile ilişkisi bulunamamıştır ($P > 0,05$). Ancak EGFR amplifikasyonu, MDM2 amplifikasyonu ile ilişkili bulunmuştur ve bu ilişki orta düzeyde saptanmıştır ($P < 0,05; 0,4 \leq \kappa \leq 0,6$) (Özdamar, 2013).

P16 gen delesyonu, TP53 gen delesyonu ve MDM2 gen amplifikasyonu ile ilişkisi bulunamamıştır ($P > 0,05$).

TP53 gen delesyonu ile MDM2 amplifikasyonu ilişkili bulunmuş ve bu ilişki orta düzeyde saptanmıştır ($P < 0,05; 0,4 \leq \kappa \leq 0,6$) (42).

Malign melanom ve melanositik nevüs olgularının FISH sonuçları χ^2 testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Malign melanom ve melanositik nevüs olguları arasında EGFR gen amplifikasyonu açısından anlamlı bir fark bulunmuştur ($P < 0,05$). İstatistiksel sonucu Tablo 4.5. te verilmiştir.

Ülser, lenf infiltrasyonu, büyüme tipi ve kanser tipi ile; EGFR amplifikasyonu, MDM2 amplifikasyonu, TP53 delesyonu ve P16 delesyonu ile aralarında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Clark level, breslow kalınlığı ve mitoz oranı/mm² değişkenleri ile MDM2, P16 ve TP53 genetik analiz sonuçları arasındaki ilişki aberasyon saptanan olgu sayısının az olması sebebiyle değerlendirilememiştir. Mitoz oranı, Clark level ve breslow kalınlığı ile EGFR gen amplifikasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Tablo 4.5. EGFR amplifikasyonun malign melanom ve melanositik nevüs sonuçlarının karşılaştırılması

egfr * grup Crosstabulation

Count		grup		Total
		melanom	nevus	
egfr	neg	9	23	32
	poz	7	0	7
Total		16	23	39

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	12,264 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	9,473	1	,002		
Likelihood Ratio	14,778	1	,000		
Fisher's Exact Test				,001	,001
Linear-by-Linear Association	11,949	1	,001		
N of Valid Cases	39				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,87.

b. Computed only for a 2x2 table

5- TARTIŞMA

Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda, Patoloji Anabilim Dalı'nda tanısı konulmuş melanositik lezyon olgularına ait örnekler çalışarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma grubumuzu; onaltı malign ve yirmidört benign doku örneği oluşturmuştur. Çalışmamızda, malign melanom ve melanositik nevüs olgularında EGFR, P16, TP53 ve MDM2 gen bölgelerindeki aberasyonlar FISH yöntemi ile analiz edilmiştir.

5.1- Olgularda FISH ile Bulunan Aberasyonların Değerlendirilmesi

Çalışmamız sonucunda 16 malign melanom olgusunun 7'sinde (%43,75), 24 melanositik nevüs olgusunun 4'ünde (%17) aberasyon saptadık.

Rakosy ve arkadaşları 2007 yılında, EGFR gen kopya sayısının birincil deri malign melanomlarıyla olan ilişkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar birincil deri malign melanomlu 81 hastada FISH analiziyle EGFR gen amplifikasyonuna ve hastaların klinikopatolojik parametrelerin uyumuna bakmışlardır. Altı hastada EGFR gen amplifikasyonu bulunmuş. Ellidört hastada polizomi 7 bulunmuş ve bunların %72'sinde EGFR gen amplifikasyonu tespit edilmiştir. Tüm örneklerde CEP7 ve EGFR sinyalleri birlikte sayılmasına rağmen CEP7 kopya sayısı 1,7 ve 6 arasında, EGFR gen kopya sayısı ise 1 ila 8 sinyal arasında gözlenmiştir. Melanom hastalarında 7. kromozom polizomisi ile EGFR gen amplifikasyonun ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. EGFR gen amplifikasyonunu düşük (>CEP 7, kopya sayısı <5) ve yüksek (>CEP 7, kopya sayısı >5) seviye olarak sınıflandırmışlardır. Düşük seviye EGFR gen amplifikasyonun protein ekspresyonu ilişkili olduğu ancak yüksek seviyeli amplifikasyonun protein ekspresyonuyla korale olmadığını savunmuşlardır. EGFR gen kopya sayısının melanom gelişiminde rol oynadığı ve terapötik müdahale gelişimi ile metastaz oluşumu için prognostik marker olarak kullanılabileceğini savunmuşlardır (Rákosy et al., 2007).

Boone ve arkadaşları 2011 yılında, EGFR'nin melanomda klinik önemini ve tedavisel hedef olma potansiyelini araştırmışlardır. Sentinel lenf nodu durumu bilinen 114 melanom hastasının, melanom hücre dizilerinde EGFR gen amplifikasyonunu FISH yöntemiyle ve protein ekspresyonunu immünohistokimya ile araştırmışlardır. Bu melanom hücre dizilerine farklı konsantrasyonlarda cetuximab verilmiştir. Hastaların FISH analizi sonucunda 26'sında 7.kromozomun polizomisini bulmuşlardır. Çalışmanın sonucunda EGFR protein ekspresyonun sentinel lenf nodu ile ilişkili olduğunu ama sağ kalım süresiyle ilişkili olmadığını göstermişlerdir. EGFR polizomisi oranının tümör kalınlığı ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Değişik

konsantrasyondaki cetuximab hücrelerin invaziv kapasitesini düşürmüş ancak hücrelerin büyümesi yada yaşayabilirliğini değiştirmemiştir. Melanom gelişiminde ve metastazında EGFR geninin rolü olduğunu savunmuşlardır (Boone et al., 2011).

Gammon ve arkadaşları 2012 yılında, benign ve malign melanositik tümörlerin birbirinden ayrılması için yüksek özgünlüklü ve ayırıcı FISH analizi yapmışlardır. Malign ve benign ayırmak için 6p25(RREB1), 6q23(MYB), CEP6 (sentromer 6) ve 11q13(CCND1) içeren prob setinin faydalı olduğu bilinmektedir. Ancak bunların hassasiyetleri melanomlarda yaklaşık %70 oranındadır. Ayrıca deneyimsiz araştırmacılar tarafından gerçek tetraploidi kazançlarının yorumlanmasında zorluklar yaşanabilmektedir. Bu yüzden 152 melanom ve 170 nevi, toplam 322 tümörü 4 farklı gruba ayırarak çalışmışlardır. Birinci grupta 31 melanom ve 34 nevi incelenmiş ve P16, CEP9, MYC, BRAF, CEP17, CEP10, ZNF217 ve COX2 bölgelerine bakılmıştır. İkinci grupta 49 melanom ve 51 nevi, 3. grupta 72 melanom ve 85 nevi, 4. grupta 51 melanom ve 51 nevi incelenmiş ve RREB1, P16, CCND1 ve MYC bölgelerine bakılmıştır. P16'nin melanom ve nevi arasında ayırt edici özelliği gözlenmiştir. Bu çalışmada melanomlarda sık sık P16 delesyonu gözlemlenirken benign nevilerde hiç gözlenmemiştir. Ayrıca çalışmada P16 delesyonu özellikle spitzoid melanomlarda daha sık gözlenmiştir. Melanomlarda P16 gen bölgesinin, FISH prob hedefleri arasına konmasını tavsiye etmişlerdir. Sonuç olarak seçtikleri 6p25, 9p21, 11q13 ve 8q34 prob setinin önceden kullanılan prob setinden daha faydalı olabileceğini göstermişlerdir (Gammon, Beilfuss, Guitart, & Gerami, 2012).

Karsinogenezde önemli role sahip olduğu bilinen TP53 genin delesyon ya da mutasyonu tüm kanser çeşitlerinde gözükmez (Freedman et al., 1999). Ancak TP53 yolağının tüm kanser türlerinde fonksiyonel inaktivasyonunun etkili olduğu düşünülmektedir (Vogelstein et al., 2000). Malign melanomda TP53 yolağının fonksiyonel inaktivasyonu ve TP53 genin etkisini göstermeyi amaçlayan Chin ve arkadaşları, TP53 mutant fare üretmişlerdir. Bu fareler halihazırda yabancı tip TP53 aleli LOH(Loss of heterozygosity) karakterize kutanöz melanoma geliştirmiş ve TP53 normal olan ancak P16 delesyonlu melanoma modelinin moleküler ayna görüntüsü olarak bildirilmiştir. Sözü edilen fare genetik çalışmaları melanoma baskılanmasında görevli olan TP53 yolağının P16-TP53 inaktivasyonu nedeniyle işlevsel kayıba uğradığını düşündürmektedir (Chin et al., 2006).

Muthusamy ve arkadaşları 2006 yılında, 53 hastanın kültüre edilmemiş melanom örneklerinden CDK4 ve MDM2 amplifikasyon durumunu incelemişlerdir. Elli üç hastadan 3 tanesinde CDK4 ve MDM2 amplifikasyonu bulmuşlardır. MDM2 amplifikasyonun ya da aşırı ekspresyonun TP53 tümör süppresör geni fonksiyonel olarak

baskıladığı gözlemlenmişlerdir. Ayrıca MDM2 geni P16 tümör süpresör genin ürünü olan P14ARF proteini tarafından denetlendiğini savunmuşlardır (Muthusamy et al., 2006). Chin ve arkadaşları da ARF-MDM2-TP53 yolağını desteklemişlerdir. Bu yolak üzerinde MDM2 gen amplifikasyonunun insan melanomların %3-%5 arasında gözlemlendiğini genel olarak TP53 genin fonksiyonel kaybının P16 delesyonlarından kaynaklanabileceğini savunmuşlardır (Chin et al., 2006).

Muthusamy ve arkadaşları da MDM2 ve CDK4 gen amplifikasyonlarının melanom üzerindeki etkisini incelerken ARF-MDM2-TP53 yolağının işlevini doğrulamışlardır (Muthusamy et al., 2006). Malign melanom: genomik çağda genetik ve terapötikler adlı review çalışmasında Chin ve arkadaşları, melanomda TP53 genin fonksiyonel baskılanmasının yolaklarını ve bu yollardan ARF-MDM2-TP53 yolağının işlevlerini göstermişlerdir (Chin et al., 2006).

Malign melanom hastalığı üzerine yapılan çalışmalar sonucunda EGFR, P16, TP53 ve MDM2 gen bölgelerinin hastalığın gelişimi ve metastazında rol oynayabileceklerini savunmuşlardır. Çalışmamız sonucunda melanom olgularında EGFR amplifikasyonu %43,75 oranında saptanmıştır. EGFR amplifikasyonu pozitif hastaların %42,85'inde MDM2 amplifikasyonu da eşlik etmektedir. Bulgularımız Rakosy ve arkadaşları ile Boone ve arkadaşları ortaya koydukları, melanom gelişimi ve metastazında EGFR gen amplifikasyonunun ilişkisini doğrular niteliktedir. EGFR amplifikasyonu malign melanom olgularının 7'sinde pozitif bulunurken melanositik nevüs olgularda gözlenmemiştir. Çalışmamızda 16 malign melanom olgusunda 1 tanesinde P16 delesyonu ile EGFR amplifikasyonu birlikte bulunmuştur. Melanositik nevüslerden 1 tanesinde sadece P16 delesyonu bulunmuştur. Ancak melanositik nevüs olgularında P16 delesyonu hakkında kaynak bulunamamıştır. TP53 delesyonu 16 melanom olgusunda 1(olgu 10) tane saptanmıştır ve delesyonun yanında MDM2 ve EGFR gen amplifikasyonu da görülmüştür. İki olguda (olgu 13 ile olgu 7) MDM2 amplifikasyonu ve EGFR amplifikasyonu vardır. Bu iki olgunun patolojik özellikleri benzerlik göstermektedir. Ancak olgu 10 ile farklı patolojik özellikler göstermektedir.

Gammon ve arkadaşlarının, benign ve malign melanositik tümörlerin birbirinden ayrılması için yaptıkları çalışmada EGFR genini tercih etmemişlerdir. Oysa ki Rakosy ve arkadaşları EGFR gen kopya sayısının melanom gelişmesinde rol oynadığını ve prognostik marker olarak kullanabileceğini savunmuşlardır. Boone ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada EGFR polizomisinin tümör kalınlığı ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda EGFR gen amplifikasyonunun, malign melanom olgularının histopatolojik özellikleri ile anlamlı bir ilişkisi bulunamamıştır. Ancak malign melanom

olgularında %43,75 oranında bulduğumuz EGFR amplifikasyonu açısından istatistiksel olarak melanositik nevüs olguları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Çalışmamızda ayrıca EGFR gen amplifikasyonu ve MDM2 amplifikasyonu arasında orta düzeyde bir uyumluluk bulunmuştur. Muthusamy ve arkadaşları çalışmalarında TP53 tümör süppresör geni fonksiyonel olarak baskılanmasında MDM2 amplifikasyonun ya da aşırı ekspresyonun etkili olduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca P16 tümör süppresör geninin MDM2 genini denetlediğini savunmuşlardır. Buna ek olarak malign melanomda MDM2 geni ile EGFR geni arasındaki ilişkinin de araştırılmasının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Muthusamy ve arkadaşlarının gösterdikleri MDM2 amplifikasyonu ile TP53 delesyonu arasındaki uyum bizim çalışmamızda da bulundu. Ancak MDM2 gen amplifikasyonu ile EGFR gen amplifikasyonu arasında uyum bulmamıza rağmen TP53 delesyonu ile EGFR gen amplifikasyonu arasında bir uyum bulamadık. Çalışmamız sonucunda, Muthusamy ve arkadaşlarının öngördükleri ARF-MDM2-TP53 yolağın dışında malign melanom gelişmesinde MDM2 ve EGFR genlerinin içerdiği başka bir yolak daha olabileceğini ya da ARF-MDM2-TP53 yolağının henüz fark edilememiş farklı kısımlarının olabileceğini düşündürdü.

Sonuç olarak çalışmamız dışında malign melanomlarda EGFR, MDM2, TP53 ve P16 genlerinin birlikte incelendiği bir çalışma araştırdığımız kadarıyla bulunmamıştır. Bu genlerin birbirleriyle bağlantılarını farklı araştırma grupları çalışmış olsalar da hepsi birlikte incelenmemiştir. Biz çalışmamızda bu genleri FISH yöntemi kullanarak inceledik. Çalışmamız sonucunda: EGFR amplifikasyonu açısından malign melanom olguları ile melanositik nevüs olguları arasında anlamlı bir farklılık bulunması, malign melanom gelişmesi ve farklılaşması açısından önemlidir. Ayrıca MDM2 ve EGFR amplifikasyonları arasında uyum bulmuş olmamız malign melanom patogenezinin anlaşılması için yeni bilgiler bulabileceğimizi göstermektedir.

5.2- Melanom Olgularında EGFR gen kopya sayısının oranlarının karşılaştırılması

Çalışmamız sonucunda 16 malign melanom olgusunun 7'sinde (%43,74) EGFR kopya sayısı artışı saptanmıştır ve bu 7 olgudan 2 olguda MDM2 kopya sayı artışı ile beraber gözlenmiştir. Bir olguda P16 delesyonu ile beraber , bir başka olguda MDM2 gen kopya sayısı artışının yanında TP53 delesyonu ile beraber gözlenmiştir.

Rakosy ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada 81 malign melanomlu 6 olguda sadece EGFR amplifikasyonu

gözlemişlerdir. Elli dört hasta ise 7.kromozom polizomi bulmuşlar ve bunların %72'sinde EGFR gen amplifikasyonu tespit etmişlerdir. Yedinci kromozom polizomisinin EGFR gen kopya sayısını artırdığını böylece EGFR gen amplifikasyonunun etkisi oluşturduğunu savunmuşlardır (Rákosy et al., 2007).

Boone ve arkadaşları 2011 yılında 114 melanomlu hasta da 26'sında (%27,7), 7. kromozom poliplodisini bulmuşlardır. Ancak sadece EGFR gen amplifikasyonu bulamamışlardır (Boone et al., 2011).

Çalışmamız sonuçları, malign melanom hastalarında 7. kromozom polizomisi gözlenmemiştir. EGFR gen amplifikasyonu melanositik nevüs olgularda hiç görülmemiştir ve malign melanom olguların histopatolojik özellikleri ile ilişki bulunmamıştır. EGFR gen amplifikasyonu açısından malign melanom ve melanositik nevüs olguları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Ayrıca MDM2 gen amplifikasyonu ile uyumlu bulunmuştur. EGFR geni ile MDM2 geni arasında bulunan bu uyumun moleküler düzeyde de araştırılarak tümör oluşum ve gelişimi hakkında yeni ipuçları elde edilebileceği düşüncesindeyiz.

EGFR gen amplifikasyonu açısından malign melanom ile melanositik nevüs olguları arasında anlamlı bir fark olması nedeniyle ayırıcı tanıda kullanabileceği düşüncesindeyiz.

5.2- Melanom olgularında P16 yeniden düzenlenmesinin oranın karşılaştırılması

Çalışmamızda malign melanom olgularında %6,25 oranında P16 delesyonu ve melanositik nevüs olgularında %4 oranında P16 delesyonu saptanmıştır. Ancak çalışmamızda P16 homozigot delesyonu bulamadık.

Gammon ve arkadaşları 2012 yılında, 152 melanoma ve 172 nevi üzerinde yaptıkları çalışmada P16 delesyonunu melanomların yaklaşık %50'sinde gözlenmiş ancak hiçbir benign lezyonunda gözlememişlerdir (Gammon et al., 2012). Redon ve arkadaşları 2017 yılında, 24 spitzoid ve/veya yanlış tanımlanan melanositik tümörleri P16-Ki67-HMB45 immünohistokimya yöntemi, melanom kiti (6p25, 6q23, CEP6, 11q13) ile melanom kiti dışı (CEP3, CEP7, 9p21, CEP17, CEP8, CEPX, CEPY, 13q14, 21q22) FISH problemleri ve CGH array yönetimiyle analiz etmişlerdir. 24 örnek FISH problemleri kullanılarak 8 melanom, 2 atipikal spitzoid tümör ve 14 poliplodili nevi olarak sınıflandırmışlardır. 13 nevi ve 8 melanom P16-Ki67-HMB45 immünohistokimya skoru ile FISH analizleri uyumlu çıkmıştır. Sadece 1 olgularında P16-Ki67-HMB45 immünohistokimya skoru spitz nevüs

tanısı konulmuşsa da FISH analizinde melanomlara özgü saptanan P16 çift delesyonu saptamışlardır. Sonuç olarak histoloji ve immünohistokimya arasındaki tutarsızlıklarda sitogenetik analizlerden faydalanılması gerektiğini önermişlerdir (Redon, Guibourg, Talagas, Marcorelles, & Uguen, 2017).

Bizim çalışmamızda P16 delesyon oranı bu kadar yüksek çıkmamıştır ve 1 tane melanositik nevüs olgusunda P16 delesyonu saptanmıştır. P16 delesyonunun görülme sıklığının düşük olmasının nedeni örneklem grubumuzun malign melanom alttip çeşitliğinin fazla ve örneklem sayımızın az olmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Gammon ve arkadaşlarının çalışmasında P16 delesyonlarının malign ve benign sınıflandırılmasında kullanabileceğini öngörmüşlerdir. Bu nedenle P16 delesyon saptadığımız melanositik nevüs olgusunun histopatolojik değerlendirilmesinin tekrar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

P16 delesyonu litaretürlerdeki bulunma yüzdesinden düşük çıkmıştır. Bu durumun örneklem sayısının az olmasında kaynaklı olabileceğini veya Türkiye'deki toplum için malign melanomda P16 delesyon oranının düşük olabileceğini düşünmekteyiz. Bu ikilemi ortadan kaldırmak için çok daha geniş örneklem grubuyla hem FISH yöntemi hem de moleküler yöntemle P16 delesyon araştırılmasını önermekteyiz.

5.3- Melanom olgularında TP53 yeniden düzenlenmesinin oranın karşılaştırılması

Çalışmamızda 16 malign melanom olgusunda 1 tanesinde TP53 delesyonu ile EGFR amplifikasyonu ve MDM2 amplifikasyonu birlikte bulunmuştur. TP53 genin delesyon ya da mutasyonu tüm kanser çeşitlerinde gözükmez. Özellikle malign melanomlarda TP53 delesyon ya da mutasyonu çok ender gözükmemektedir (Freedman et al., 1999). TP53 genin fonksiyonel baskılanmasının olduğu malign melanomlar gözlenmektedir (Chin et al., 2006). Chin ve arkadaşları yaptığı çalışmayla TP53 genin fonksiyonel çalışma yollarını göstermişlerdir. Bu yollardan biri de ARF-MDM2-TP53 yolağıdır. Bu yolak üzerinde meydana gelebilecek değişiklikler TP53 fonksiyonel olarak baskılanmasına sebep olacaktır. Çalışmamızda TP53 delesyonu görmediğimiz ancak MDM2 amplifikasyonu saptadığımız olgularda ARF-MDM2-TP53 yolağından sapma olabileceğini düşünmekteyiz. Bu düşüncenin doğrulanması için olguların moleküler yöntemle analiz edilmesi gerekmektedir.

5.4- Melanom olgularında MDM2 kopya sayısının oranlarının karşılaştırılması

Çalışmamızda 16 malign melanom olgusunun 3 tanesinde (%18.75) MDM2 amplifikasyonu, EGFR amplifikasyonu ile beraber gözlenmiştir. Melanositik nevüslerde 3 olguda sadece MDM2 amplifikasyonu gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada TP53 fonksiyonel kaybının MDM2 geninin amplifikasyonu sonucunda ortaya çıktığı raporlanmış ve malign melanomlarda görülme sıklığının %3 ila %5 arasında olduğu belirtilmiştir (Muthusamy et al., 2006). Muthusamy ve arkadaşları 2006 yılında, elli üç hastadan 3 tanesinde MDM2 amplifikasyonu bulmuşlardır. Chin ve arkadaşları bu çalışmayı desteklemişlerdir ve ARF-MDM2-TP53 yolağının işlevini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda MDM2 amplifikasyonu malign melanomlarda öngörülen görülme sıklığından yüksek çıkmıştır ve MDM2 amplifikasyonu ile TP53 delesyonu arasında bir uyum bulunmuştur. MDM2 amplifikasyonun görülme sıklığının yüksek olmasının nedeni örneklem grubumuzun malign melanom alttip çeşitliğinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Melanositik nevüs olgularında gözlediğimiz MDM2 amplifikasyonu dikkat çekicidir. MDM2 amplifikasyonu saptadığımız 3 melanositik nevüs olgusunda tanılarının doğruluğu için tekrardan histopatolojik değerlendirmesi ve MDM2 amplifikasyon farklı bir yöntemle gösterebilmek için CGH-array yapılmasını düşünmekteyiz. Üç olgunun tanısı doğruysa melanositik nevüs olgularında MDM2 ile TP53 genleri arasındaki uyumun incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Malign melanom olgularında EGFR ve MDM2 amplifikasyonu pozitif olgularda P16 ve TP53 genin mutasyon çalışılma yapılması, genlerin arasındaki ilişkilerin açıklanmasında faydalı olabilir. Ayrıca MDM2 amplifikasyonu pozitif melanositik nevüslerde P16 ve TP53 gen mutasyonu çalışılmalarının yapılması, genlerin arasındaki ilişkilerin açıklanmasında ve histopatolojik değişimi hakkında bilgi toplanmasında faydalı olabilir.

6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, malign melanom olgularında EGFR, P16, TP53 ve MDM2 gen bölgelerinin aberasyonlarını FISH yöntemi ile ortaya konması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda;

- Malign melanom olgularının %43,75'inde aberasyon saptanmıştır.

- Görülme oranı en yüksek olan aberasyon EGFR gen amplifikasyonu (%43,75) olarak belirlenmiştir.

- EGFR gen amplifikasyonu açısından malign melanom ve melanositik nevüs olguları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur.

- Melanositik nevüs olgularının üçünde MDM2 amplifikasyonu ve birinde P16 delesyonu saptanmıştır.

- EGFR amplifikasyonu ile MDM2 amplifikasyonu arasında uyum bulunmuştur. Bu ilişki orta düzeyde saptanmıştır.

- MDM2 amplifikasyonu ile TP53 delesyonu arasında uyum bulunmuştur. Bu ilişki orta düzeyde saptanmıştır.

- EGFR, P16, TP53 ve MDM2 gen aberasyonları ile histopatolojik özellikler arasında anlamlı bir ilişkili bulunmamıştır.

Malign melanom olgularında EGFR genin amplifikasyonu tümör gelişimi açısından önemlidir. EGFR genin amplifikasyonu malign melanomda yüksek oranda görülmektedir. Malign melanom ve melanositik nevüs olguları arasında EGFR gen amplifikasyonu açısından önemli bir farklılık saptamamız sebebiyle, melanom ile nevüs tanısı ayırımında kullanılabilir olabileceği düşüncesindeyiz.

Malign melanomda MDM2 geni ile EGFR geni arasında bulunan uyumun moleküler düzeyde de araştırılarak tümör oluşum ve gelişimi hakkında yeni ipuçları elde edebileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda melanositik nevüs olgularında gözlediğimiz MDM2 gen amplifikasyonu dikkat çekicidir. Tümör gelişimde önemli rol oynayan TP53 genin fonksiyonel baskılayıcı genlerinden olan MDM2 geninin melanositik nevüslerde moleküler düzeyde çalışılarak olası tümör gelişimi hakkında bilgi verebileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Anlar, S. D. (2012). Melanositik tümörlerde DNA kopya sayısı ve kromozomal değişikliklerin floresan in situ hibridizasyon yöntemi ile değerlendirilmesi, ayırıcı tanı ve prognostik öneminin araştırılması, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Adana
- Arsav, V. (2006). Benign, sınırda ve malign pigmente deri lezyonlarında ayırıcı tanısında VEGF, BFGF, P- CADHERİN ve E- CADHERİN'in rolü, Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Tıp Fakültesi, Kayseri
- Bogdan, I., Burg, G., & Böni, R. (2001). Spitz nevi display allelic deletions. *Archives of dermatology*, 137(11), 1417-1420.
- Boone, B., Jacobs, K., Ferdinande, L., Taildeman, J., Lambert, J., Peeters, M., . . . Brochez, L. (2011). EGFR in melanoma: clinical significance and potential therapeutic target. *Journal of cutaneous pathology*, 38(6), 492-502.
- Boyle, P., & Levin, B. (2008). *World cancer report 2008*: IARC Press, International Agency for Research on Cancer.
- Chin, L., Garraway, L. A., & Fisher, D. E. (2006). Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes & development*, 20(16), 2149-2182.
- Cooper, G. M., & Hausmen, R. E. (2006). Hücre: Moleküler Yaklaşım (M. Sakızlı & N. Atabey,Çev), 3.baskı. İzmir : İzmir Tıp Kitapevi
- Çelik, İ., Sevinç, A., Büyükberber, S., Çoşkun, U., Yalçın, B., Mandel, N. M., Sağlam, E. K., Gökmen, E., Çoşkun, H. Ş., Abalı, H., Demirkesen, C., Akbulut, H., Erkin, G., Tezel, G. G., Gültekin, M., Boztaş, G., Gökoç, Ö., (2012). Türkiye melanom yol haritası melanom çalışma grubu
- Doğan, A. L., & Güç, D. (2004). Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Acta Medica*, 35(1), 34-42.
- Erenler, B. H. (2010). Melanositik nevüs ve malign melanom tanısında kullanılan immünohistokimyasal belirleyicilerin karşılaştırılması, Ondokuz Mayıs üniverisitesi, Tıp fakültesi, Samsun

KAYNAKLAR DİZİNİ(Devam Ediyor)

- Eren, E. (2006). Hepatoselüler Karsinomda MDM2 Gen Polimorfizmleri, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara
- Freedman, D., Wu, L., & Levine, A. (1999). Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(1), 96-107.
- Gammon, B., Beilfuss, B., Guitart, J., & Gerami, P. (2012). Enhanced detection of spitzoid melanomas using fluorescence in situ hybridization with 9p21 as an adjunctive probe. *The American journal of surgical pathology*, 36(1), 81-88.
- Goldstein, A. M., Chan, M., Harland, M., Gillanders, E. M., Hayward, N. K., Avril, M.-F., . . . Bressac-de Paillerets, B. (2006). High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer research*, 66(20), 9818-9828.
- Groeger, A., Odocha, O., Mueller, M., Salat, A., Mallinger, R., Baumgartner, S., . . . Kaiser, H. (1997). Racial variation in lung cancer. *Anticancer research*, 17(4A), 2843-2848.
- Hay, T. J., & Meek, D. W. (2000). Multiple sites of in vivo phosphorylation in the MDM2 oncoprotein cluster within two important functional domains. *FEBS letters*, 478(1-2), 183-186.
- Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J.-P., . . . Place, C. (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, 150(2), 251-263.
- Köktürk, N., Öztürk, C., & Kırışoğlu, C. (2003). Sigara ve akciğer kanseri. *Solunum*, 5(3), 139-145.
- LeBoit, P. E., Burg, G., Weedon, D., Sarasin, A., World Health Organization Classification of Tumours " Pathology and Genetics of Skin Tumours" Lyon: IARC Press 2006: 50-120
- Mayo, L. D., Turchi, J. J., & Berberich, S. J. (1997). Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Cancer research*, 57(22), 5013-5016.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Shieh, S.-Y., Ikeda, M., Taya, Y., & Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91(3), 325-334.
- Sini, M. C., Manca, A., Cossu, A., Budroni, M., Botti, G., Ascierto, P. A., . . . Casula, M. (2008). Molecular alterations at chromosome 9p21 in melanocytic naevi and melanoma. *British Journal of Dermatology*, 158(2), 243-250.
- Işık, S. (2014). Malign melanom olgularında moleküler sitogenetik çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Eskişehir
- Şimşek, H. A. (2009). Derinin melanositik lezyonlarının ayırıcı tanısında moleküler yöntemlerin katkısı, Uzmanlık tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ankara
- Sümer-Turanlıgil, N. C., & Uyanıkgil, Y. (2010). Hücre İçi Sinyal Yolakları ve Klinik Yansımaları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 19(3).
- Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), 307.
- Wade, M., Li, Y.-C., & Wahl, G. M. (2013). MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 13(2), 83.
- Zhang, Y., Xong, Y., & Yarbrough, W. G. (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*, 92; 725-734.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Tolga TÖRE

Doğum Tarihi ve Yeri : 03.06.1988 KARAMAN

Uyruğu : T.C.

Medeni Durumu : Bekar

İletişim Adresleri : Tunalı Mah. Sevim Sok 3/7
Tepebaşı/ESKİŞEHİR

Eğitim Durumu

1996-1998: İlköğretim, Şeker İlköğretim Okulu

1998-1999: İlköğretim, Cumhuriyet İlköğretim Okulu

1999-2002: İlköğretim, Cumhuriyet İlköğretim Okulu

2002-2006: Lise, Ali Güral Lisesi - KÜTAHYA

2006-2011: Lisans, Hacettepe Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü

2012-2018: Y.Lisans, ESOĞÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik A.D.

Yabancı Diller: İngilizce

Katıldığı Ulusal Bilimsel Toplantılar

1. XI. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Eylül, 2014, İstanbul