

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

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERLERİYLE**  
**İLİŞKİLENDİRİLMİŞ TÜMÖR SÜPRESSÖR GENLERİN**  
**MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION**  
**(MLPA) YÖNTEMİ İLE METİLASYON PATERNLERİNİN**  
**İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**AHMET ULUDAĞ**

**DANIŞMAN**

**PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN**

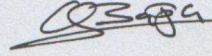
**EYLÜL, 2007**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

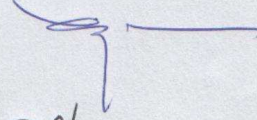
Ahmet ULUDAĞ'ın Doktora Tezi olarak hazırladığı "Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseriyle ilişkilendirilmiş Tümör Süpressör Genlerin Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemi ile Metilasyon Paternlerinin İncelenmesi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

11.09.2007

Üye: Prof.Dr. Gülseren BAĞCI



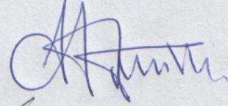
Üye: Prof.Dr. Muzaffer METİNTAŞ



Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN



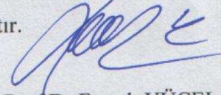
Üye: Doç.Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU



Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 14./09./2007 tarih ve 712../2317.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof.Dr.Ferruh YÜCEL  
Enstitü Müdürü

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

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERLERİYLE**  
**İLİŞKİLENDİRİLMİŞ TÜMÖR SÜPRESSÖR GENLERİN**  
**MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION**  
**(MLPA) YÖNTEMİ İLE METİLASYON PATERNLERİNİN**  
**İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**AHMET ULUDAĞ**

**DANIŞMAN**

**PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN**

**EYLÜL, 2007**

## ÖZET

Akciğer kanseri, tüm dünyada mortalitesi en yüksek kanser türüdür ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedenleri arasında 2. sırada yer almaktadır. Metilasyon bir epigenetik mekanizma olup DNA düzeyinde herhangi bir mutasyon olmamasına rağmen ilgili genin eksprese olmasını engelleyen bir moleküler mekanizmadır.

Çalışmada henüz çok yeni bir yöntem olan Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) tekniği ile akciğer kanserleriyle daha önce ilişkilendirilmiş 24 ayrı tümör süpressör genin promoter bölgelerinin metilasyon paternlerinin SALSA MS-MLPA ME001 tumorsuppressor probemix kiti kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmaya İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesinde, histopatolojik olarak incelenerek “küçük hücreli olmayan akciğer kanseri” tanısı almış 100 olgu dahil edildi..Her hastaya ait doku örneklerinden kanser dokusu içeren 5 mikronluk kesitlerden elde edilen DNA örnekleri çalışma grubu olarak, aynı hastaya ait kanser dokusu içermeyen kesitlerden elde edilen DNA örnekleri de kontrol grubu olarak çalışmaya alındı.

Çalışmada, akciğer kanserli tümöral ve çevre akciğer dokularında birbirlerine yakın oranlarda en sık CDKN2B, BRCA1, CDH13 ve HIC1 prob bölgelerinde metilasyon görüldü. Yine tümöral ve çevre dokularda PTEN, TIMP3, ATM, VHL, CD44, CDKN1B, RASSF1, IGSF4 ve ESR1 prob bölgelerinde de metilasyon saptandı. APC, CDKN2A, MLH1, RARB, CHFR ve GSTP1 prob bölgelerinde farklı oranlarda, tümöral dokularda metilasyon görülürken, çevre akciğer dokularında bu prob bölgelerinde metilasyon saptanmadı.

Sonuç olarak MS MLPA yönteminin akciğer kanserlerinin metilasyon profillerinin taramasında kullanılabilecek, ucuz ve hızlı sonuç verebilen bir teknik olduğu görülmüştür. MS MLPA yönteminin diğer metilasyon tarama yöntemleriyle karşılaştırılarak bir an önce sensitivite ve spesivitesinin belirlenmesi ve akciğer kanserinin erken tanısında rutin kullanıma geçirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Akciğer Kanserleri, Tümör Süpressör Gen, Metilasyon, MS-MLPA

## **SUMMARY**

Lung cancer has the leading mortality rate among all cancers and it is the second most common cause of death following deaths from cardiovascular diseases. DNA methylation is a well-defined epigenetic mechanism and it is a molecular mechanism which prevents gene expression although there is no mutation in DNA level.

In this study, it was aimed to analyze methylation pattern of 24 tumor suppressor genes promoter regions previously associated with lung cancer using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) technique SALSA MS-MLPA ME001 tumor suppressor probemix kit.

This study was performed by analyzing 100 archival samples which had been previously examined histopathologically and diagnosed as “non-small cell lung cancer” in İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesi. DNA extracts from 5 micron paraffin-embedded tissue sections which contain cancerous tissues were used as sample group and 5 micron paraffin-embedded tissue sections which contain well-differentiated normal tissues from the same patients were used as control group in the study.

In the study, similar methylation frequencies were found in some regions in both cancerous and well-differentiated normal tissues. The regions which are most frequently methylated were CDKN2B, BRCA1, CDH13 ve HIC1 probe regions. Methylation was also observed in PTEN, TIMP3, ATM, VHL, CD44, CDKN1B, RASSF1, IGSF4 ve ESR1 probe regions in both type of tissues. Methylation in different frequencies in APC, CDKN2A, MLH1, RARB, CHFR ve GSTP1 probe regions were found in cancerous tissues but not in well-differentiated normal tissues.

As a conclusion, it was determined that MS MLPA is a technique which can give cheap, fast and reliable results in screening methylation pattern of lung cancers. We think that MS MLPA technique should be compared with other methylation screening techniques immediately to determine its sensitivity and specificity and this technique should be instituted to be used in routine early diagnosis of lung cancer.

**Key Words:** Lung Cancer, Tumor Suppressor, Methylation, MS-MLPA

# **İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
<b>ÖZET</b>	iv
<b>SUMMARY</b>	v
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vi
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b>	x
<b>TABLO DİZİNİ</b>	xii
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	xiii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. Kanser Nedir?	5
2.1.2. Kanser Türleri	6
2.1.3. Kanserin Gelişimi	7
2.1.4. Kanserin Nedenleri	9
2.1.5. Kanser Hücrelerinin Özellikleri	10
2.2. Kanser ve Genetik	12
2.2.1. Onkogenlerin Aktivasyonu	15
2.2.2. Tümör Baskılayıcı Genlerin İnaktivasyonu	16
2.2.3. Hücre Döngüsünün Kontrolünde Rol Oynayan Proteinler	16
2.2.4. DNA Tamir Mekanizmasında Yer Alan Genlerdeki Değişikler	17

2.2.5. Kromatin Yapısının Transkripsiyonla İlişkisi	18
2.3. DNA Metillenmesi	20
2.4. DNA Metilasyonu ve Kanser	24
2.5. Akciğer Kanseri	27
2.5.1. Akciğer Kanseri İçin Risk Faktörleri	27
2.5.2. Akciğer Kanserin Belirtileri	28
2.5.3. Akciğer Kanserin Tipleri	29
2.5.4. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	30
2.5.5. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri	30
2.5.6. Akciğer Kanseri Evrelendirme	31
2.5.6.1. Evre Grupları	32
2.6. Akciğer Kanseri ve DNA Metilasyonu	33
2.7. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemi	34
2.7.1. Akciğer Kanseri MLPA Tekniğinin Kullanımı	38
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	<b>39</b>
3.1. Gereçler	39
3.1.1. Materyal Seçimi	39
3.1.2. Kullanılan Gereçler	39
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	40
3.2. Yöntemler	41
3.2.1. Magna Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu İle Parafine Gömülü Dokudan DNA Elde Etme Protokolü	41
3.2.2. İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi	42
3.2.2.1. DNA Denatürasyonu Ve SALSA ME001B Probe Miks İle Hibridizasyonu	43

3.2.2.2. Ligasyon ve Enzim Kesim Reaksiyonu	43
3.2.2.3. PCR	44
3.2.2.4. ABI 310 Cihazına Yükleme	45
3.2.2.5. Değerlendirme	45
<b>4. BULGULAR</b>	47
4.1. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik ve Klinik Özellikleri	47
4.2. Araştırma Grubu Bireyleri MLPA Bulguları	49
4.2.1 DNA Miktarının Yeterliliğinin Belirlenmesi	50
4.2.2 Denatürasyon Kalitesinin Belirlenmesi	50
4.2.3 Metilasyona Duyarlı HhaI Endonükleaz Kesim Sonuçları	53
<b>5. TARTIŞMA</b>	65
5.1. Elde Edilen Verilerinin Literatür Bilgileri İle Karşılaştırılması	66
5.1.1. <i>TIMP3</i> Prob Bölgesindeki Metilasyon	67
5.1.2. <i>APC</i> Prob Bölgesindeki Metilasyon	68
5.1.3. <i>CDKN2A</i> Prob Bölgesindeki Metilasyon	69
5.1.4. <i>MLH1</i> Prob Bölgesindeki Metilasyon	70
5.1.5. <i>ATM</i> , <i>IGSF4</i> , <i>CD44</i> ve <i>CHFR</i> Prob Bölgelerinin Metilasyonu	70
5.1.6. <i>RARB</i> ve <i>GSTP1</i> Prob Bölgelerinin Metilasyonu	72
5.1.7. <i>CDKN2B</i> Prob Bölgesi Metilasyonu	73
5.1.8. <i>RASSF1</i> ve <i>ESR1</i> Prob Bölgelerinin Metilasyonu	73
5.1.9. <i>BRCA1</i> ve <i>HIC1</i> Prob Bölgelerinin Metilasyonu	74
5.1.10. <i>CASP8</i> , <i>CDKN1B</i> , <i>PTEN</i> , <i>VHL</i> ve <i>CD13</i> Prob Bölgelerinin Metilasyonu	75
5.1.11. <i>BRCA2</i> , <i>DAPK1</i> , <i>TP73</i> ve <i>FHIT</i> Prob Bölgelerinin Metilasyonu	78



5.2. Metilasyon Spesifik MLPA Yönteminin Literatürde En Sık Kullanılan Metilasyon Tarama Yöntemleriyle Karşılaştırılması	79
5.3. Metilasyon Spesifik MLPA Yönteminin Akciğer Kanserlerinde Kullanılması	81
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>83</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>87</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>94</b>

<b>ŞEKİL DİZİNİ</b>		<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 2.2.5.1:</b>	Asetilasyon ve kromatin oluşum ilişkisi	19
<b>Şekil 2.3.1:</b>	Sitozinin metillenerek 5-metilsitozinin oluşumu	21
<b>Şekil 2.3.2:</b>	Gen ekspresyonunda metilasyon ve asetilasyon ilişkisi	23
<b>Şekil 2.7.1:</b>	MS-MLPA yönteminin basamakları ve çalışma prensibi	36
<b>Şekil 3.2.1.1:</b>	Örnek DNA'lara ait %1'lik agaroz jel görüntüsü	42
<b>Şekil 4.2.2.1:</b>	DQ ve DD kontrol pikleri yardımıyla değerlendirmeye alınamayan ve alınan pik görüntüleri	51
<b>Şekil 4.2.2.2:</b>	İnternal kontrolde kullanılan olgunun enzim kesimi yapılmayan örneğinden çalışılan MLPA görüntüsü ve prob bölgelerinin görünümü	52
<b>Şekil 4.2.2.3:</b>	İnternal kontrolde kullanılan olgunun enzim kesimi yapılan örneğinden çalışılan MLPA görüntüsü ve prob bölgelerinin görünümü	52
<b>Şekil 4.2.3.1:</b>	Normal metilasyon profiline sahip bir hastanın tümör dokusuna ait enzim kesimi yapılmamış MLPA görüntüsü	53
<b>Şekil 4.2.3.2:</b>	Normal metilasyon profiline sahip bir hastanın tümör dokusuna ait enzim kesimi yapılmış MLPA görüntüsü	54
<b>Şekil 4.2.3.3:</b>	Tümoral akciğer dokusunda <i>CDKN2B</i> geninde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü	55
<b>Şekil 4.2.3.4:</b>	Şekil 4.2.3.3'deki hastanın çevre akciğer dokusunun pik görüntüsü	55
<b>Şekil 4.2.3.5:</b>	Tümoral akciğer dokusunda <i>BRCA1</i> geninde metilasyon saptanan bir olgunun pik görüntüsü	56
<b>Şekil 4.2.3.6:</b>	Şekil 4.2.3.5'deki hastanın çevre akciğer dokusundan elde edilen ve herhangi bir gende metilasyon içermeyen pik görüntüsü	56

<b>ŞEKİL DİZİNİ ( Devam Ediyor)</b>		<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 4.2.3.7:</b>	Çevre akciğer dokusunda <i>CDH13</i> ve <i>ESR1</i> prob bölgelerinde metilasyon saptanan hastanın tümoral dokusundan elde edilen ve metilasyon içermeyen MLPA pik görüntüsü.	57
<b>Şekil 4.2.3.8:</b>	Şekil 4.2.3.7'deki hastanın çevre dokusundan elde edilen ve <i>ESR1</i> ile <i>CDH13</i> genlerinde metilasyon saptanan MLPA pik görüntüsü	57
<b>Şekil 4.2.3.9:</b>	<i>CDKN2B</i> , <i>BRCA1</i> , <i>VHL</i> , <i>ATM</i> , <i>CDKN1B</i> ve <i>HIC1</i> prob bölgelerinde metilasyon saptanan bir hastanın tümör dokusuna ait MLPA pik görüntüsü	58
<b>Şekil 4.2.3.10:</b>	<i>TIMP3</i> , <i>PTEN</i> ve <i>CDH13</i> prob bölgelerinde metilasyon saptanan bir olgunun çevre akciğer dokusundan elde edilen MLPA pik görüntüsü	59

## TABLO DİZİNİ

## Sayfa

<b>Tablo 2.5.6.1:</b>	Akciğer Kanserlerinde Yeni Uluslararası TNM Sistemi	32
<b>Tablo 2.5.6.1.1:</b>	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserinde Evre Grupları	33
<b>Tablo 2.7.1:</b>	SALSA MS-MLPA ME001B tumor suppressor probemix içinde mevcut olan kontrol problemleri ve incelenecek genlere ait problemlerinin listesi	37
<b>Tablo 4.1.1:</b>	Hastaların yaş gruplarına göre dağılımları	47
<b>Tablo 4.1.2:</b>	Hastaların ailelerinde kanser öyküsü varlığı dağılımı	48
<b>Tablo 4.1.3:</b>	Vakaların histopatolojik tanılarına göre dağılımları	48
<b>Tablo 4.1.4:</b>	Vakaların Grade'lerine göre dağılımları	48
<b>Tablo 4.1.5:</b>	Vakaların TNM sınıflamasına göre dağılımları	49
<b>Tablo 4.2.3.1:</b>	Çevre ve tümöral dokularda saptanan metilasyon sıklıkları	60
<b>Tablo 4.2.3.2:</b>	T1, T2 ve T3'lü olguların tümör dokularında saptanan metilasyon sıklıkları	61
<b>Tablo 4.2.3.3:</b>	T1, T2 ve T3'lü olguların çevre dokularında saptanan metilasyon sıklıkları	61
<b>Tablo 4.2.3.4:</b>	N0, N1 ve N2'li olguların tümör dokularında saptanan metilasyon sıklıkları	62
<b>Tablo 4.2.3.5:</b>	N0, N1 ve N2'li olguların çevre dokularında saptanan metilasyon sıklıkları	62
<b>Tablo 4.2.3.6:</b>	M0 ve M1'li olguların tümör dokularında saptanan metilasyon sıklıkları	62
<b>Tablo 4.2.3.7:</b>	M0 ve M1'li olguların çevre dokularında saptanan metilasyon sıklıkları	63
<b>Tablo 4.2.3.8:</b>	Grade'lere göre saptanan metilasyon sıklıkları	64

## ***SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ***

### **Simgeler Açıklama**

<b>ABD:</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>AJCC:</b>	Amerikan Kanser Birliği
<b>BAC:</b>	Bronkoalveoler Kanser
<b>CDK:</b>	Siklin Bağımlı Kinaz
<b>CDI:</b>	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri
<b>cm:</b>	Santimetre
<b>CSF:</b>	Koloni Stimüle Edici Faktör
<b>dk:</b>	dakika
<b>DNA:</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>DD:</b>	DNA Denatürasyonu
<b>DQ:</b>	DNA Kalitesi
<b>KHAK:</b>	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
<b>KHOAK:</b>	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
<b>LOH:</b>	Loss of Heterozygosity
<b>MBD</b>	Metile Bağlanma Domaini
<b>MLPA:</b>	Multiplex Ligation dependent Probe Amplification
<b>MS-MLPA</b>	Metilasyon Spesifik Multiplex Ligation dependent Probe Amplification
<b>MSP</b>	Metilasyon Spesifik Polymerase Chain Reaction
<b>mm:</b>	Milimetre
<b>ng:</b>	Nanogram
<b>PCR:</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>RNA:</b>	Ribonükleik Asit
<b>RT-PCR</b>	Real Time Polymerase Chain Reaction
<b>TNM:</b>	Tümör Node Metastaz
<b>UICC</b>	Uluslararası Kansere Mücadele Birliği
<b>WHO:</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>µl:</b>	Mikrolitre
<b>µg:</b>	Mikrogram

## **1. GİRİŞ ve AMAC**

Kanser, günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biridir ve görülme sıklığının giderek artması nedeniyle toplum sağlığını tehdit eden önemli hastalıkların başında yer almaktadır. Enfeksiyon hastalıklarının gelişen antibiyotik kullanımlarıyla kontrol altına alınması; diğer hastalıklara karşı etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi sonucu yaşam standardının yükselmesi ile ortalama yaşam süresinin uzaması, kanser sıklığının günümüzde artmasının en önemli sebeplerinin başında gelmektedir. Ayrıca kanser tanısında kullanılan yöntemlerin baş döndürücü bir hızla ilerlemesi ve maliyetlerinin düşmesi sebebi ile daha çok hastanın hekime başvurması ve gelişen teknoloji ile çevresel karsinojenlere maruziyetin artışı kanser sıklığını arttıran diğer etkenlerdir(71).

Kanser, Sağlık Bakanlığı'na "bildirimi zorunlu" bir hastalık olmasına rağmen ülkemizde gerçek kanser insidansı bilinmemektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 2003 yılına ait kanser raporunda, global kanser oranının hızla arttığı ve 2020 yılında, bu oranın %50 artarak 15 milyon kişiyi etkileyebileceği bildirilmiştir. Akciğer kanserinin yıllık 1.2 milyon yeni vaka ile birlikte dünyada en yaygın kanser tiplerinden biri olduğu da bu raporla açıklanmıştır(68). Echimane, 2000 yılı için 10 milyon yeni kanser vakası, 6 milyon kanserden ölüm ve 22 milyon kanserli hasta hesaplamıştır. Yaptığı çalışmada en sık görülen kanserler akciğer, meme, kolorektal, mide ve karaciğerdir(9,34).

Tüm kanserlerin %13,4'ünü akciğer kanseri oluştururken, tüm kanser ölümlerinin %28,4'ünden akciğer kanseri sorumludur. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde akciğer dışı kanserlerde beş yıllık sağkalım %52 iken, akciğer kanserinde %14'dür(4). Sigaranın akciğer kanserine sebep olduğunun bilinmesine rağmen; tüm sigara içicilerin sadece % 10-20'sinde akciğer kanseri gelişimi, genetik yatkınlığın önemine işaret etmektedir(4,56). Akciğer kanserli hastaların hem sigara içen hem de içmeyen akrabalarında akciğer kanseri riski 2-4 kat artmıştır. Artmış ailesel riskin; yaş, cinsiyet,

mesleksel maruziyet ve sigara içiciliğinden bağımsız olduğu ve akciğer kanserinde kalıtımın ilişkili olduğu ileri sürülmüştür(56,67).

WHO'nun verileri; sigara kullanımının yılda 5 milyon insanın ölümüne yol açtığını, bu sayının önümüzdeki 20 yıl içerisinde iki katına çıkmasının beklendiğini belirtmekte, tahminlere göre, bugün tüm dünyada 1,3 milyar civarında olan sigara kullanıcılarının sayısının 2025 yılında 1,7 milyarı bulması beklenmektedir(68).

Risk, sigara içme süresi, toplam içilen sigara, başlama yaşı ve içilen sigaranın türüne göre değişmektedir. Aktif sigaradan sonra ikinci risk faktörü pasif sigara maruziyetidir. Pasif sigara maruziyetinin tek başına kanser riskini ortalama 1,2-1,3 kat arttırdığı bildirilmektedir(67).

Ailede akciğer kanseri olması akciğer kanserine yakalanma riskini artırmaktadır. Ailede akciğer kanseri öyküsü olan ve hiç sigara içmemiş bir kadında akciğer kanseri gelişme riskinin aile öyküsü olmayanlara göre 2,8 kat arttığı bildirilmektedir. Yine asbest ile uğraşan kişilerde, çeşitli kimyasal maddelerle çalışılan iş kollarındaki işçilerde, daha önceden akciğerden hastalık geçiren ve nedbe dokusu gelişerek iyileşen kişilerde akciğer kanseri riski topluma göre artmaktadır(69).

Bugün kanserin genetik orjinli bir hastalık grubu olduğu bilinmektedir. Karsinogenezis de farklı türlerde genlerin etkili olduğu çok aşamalı bir süreçtir. Kanserde etkili olduğu düşünülen genler; onkogenler, tümör süpresör genler ve DNA tamir genleri olarak 3 ana grup altında toplanırlar(20).

Kanser gelişiminde etkili olan genleri içeren gen ve genom mutasyonları (kromozom ve/veya gen delesyonları, amplifikasyonları, yapısal değişimler vb.) gen ürünü proteinin sentezlenmemesi, az ya da çok sentezlenmesi veya farklı proteinin sentezlenmesine neden olmaktadır ki, bu değişimler de sellüler fonksiyonlarda bozulmalara yol açmaktadır. Son yıllarda herhangi bir gen mutasyonu olmamasına rağmen ilgili genlerin ürün oluşturamaması ya da gerekenden fazla ürün

sentezlenmesine neden olan metilasyon ve asetilasyon gibi epigenetik mekanizmaların karsinogenezis sürecindeki rolleri detaylı olarak ortaya konmaktadır. Akciğer kanserinde şimdiye dek 80'den fazla genin hiper metilasyonu nedeniyle genlerdeki fonksiyon kaybı gösterilmiştir. Bu genlerin birçoğu karsinogenezisin çok erken safhalarında metile olmaktadır. Ayrıca metilasyonun geri döndürülebilir bir özellik göstermesi, kanser tedavisi için ümit verici olmuştur ki, bu da pek çok kanser tipinin epigenetik mekanizmalar açısından incelenmesinde etkili olmuştur(51,53).

Özellikle 1980'li yıllardan itibaren moleküler yöntemlerdeki hızlı gelişmeler kanserdeki moleküler mekanizmaların çözümlenmesinde etkili olmuştur. Bugün amaca yönelik kullanılabilen bir çok moleküler yöntem bulunmaktadır. Çok sayıda ligasyona dayalı amplifikasyonu (Multiplex Ligation Dependent Prob Amplification =MLPA) yöntemi 2002 yılında dünya literatürüne sunulan relatif kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemidir. Kolay uygulanabilirliği, duyarlılığı, çok sayıda bölgenin aynı anda analiz edilmesine olanak sağlaması yöntemin avantajları arasındadır.

Bu çalışmada, akciğer kanseri tanısı almış hastaların tümör dokuları ile histopatolojik açıdan normal olarak değerlendirilen çevre dokuların DNA örneklerinde metilasyona spesifik MLPA (MS-MLPA) tekniği ile akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiş 24 farklı genin promoter bölgelerindeki CpG adacıklarının metilasyon paternleri açısından değerlendirilmesi ve genlerin metilasyon profillerinin ortaya konması amaçlandı. Elde edilen veriler ile;

1. Küçük hücreli akciğer kanserlerindeki (KHOAK) metilasyon frekansının ortaya konması
2. Histopatolojik klasifikasyonlar ile metilasyon frekanslarının karşılaştırılması hedeflendi.



## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1. KANSER:**

Kanser; hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucunda hücrenin aşırı, kontrolsüz ve agresif bir biçimde çoğalmasıyla seyreden, ölümcül bir hastalıktır. Bu özellikleriyle kanser, çağımızın en önemli sağlık problemlerinden birisidir(20). Ölüm nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. Batı toplumlarında kanser insidansı her yıl 100 bin nüfus için 400 dolaylarında iken 60 yaşın üzerindeki grupta kanser sıklığı çok artmakta 300 kişide 4-5 civarına yükselmektedir. Ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında 4. sırada yer alan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra üst sıralara yükseldi. Ülkemizde kesin istatistikler bulunmamakla birlikte her yıl 150 bin kişinin kansere yakalandığı tahmin edilmektedir(13).

Amerika Birleşik Devletleri(A.B.D.)'nde kanserden ölüm, kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır(21). Yaş ve cinsiyete göre bütün ölüm sebepleri karşılaştırıldığında kanserden ölüm oranları, 35-65 yaşları arasında en üst seviyeye ulaşmakta, bununla beraber kanserden ölümlerin çoğu, 55-65 yaşları arasında görülmektedir(13). Akciğer kanserleri, ABD'de erkeklerde prostat, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sıklıkta görülür(1,62).

Tüm kanserlerin % 13.4'ünü akciğer kanseri oluştururken, tüm kanser ölümlerinin % 28.4'ünden akciğer kanseri sorumludur(8). Erkek ve kadınlarda kansere bağlı ölümler arasında A.B.D. de bütün yaş gruplarında akciğer-bronş kanseri birinci sırada yer almaktadır(21). Ülkemizde resmi rakamlara göre her yıl 20,000-25,000 yeni akciğer kanseri hastası ortaya çıkmakta ve bu rakamın 30,000-40,000 kadar ulaşabileceği düşünülmektedir. Çünkü ülkemizde güvenilir sağlık istatistikleri yoktur. Ülkemizde akciğer kanserlerinin çoğu erkeklerde görülmektedir. Kadın: erkek oranı 1:7-8

civarındadır. Ancak 1980'lerden sonra ülkemizde de kadınlardaki artan sigara tiryakiliği bu oranı kadınlar lehine belirgin şekilde etkilemektedir.

### **2.1.1. Kanser Nedir?**

Kanser; latince yengeç anlamına gelen “crab” sözcüğünden türetilmiştir. Hipokrat; hastalığın başladığı bölgeden diğer organlara yayılmasını gözlemleyerek bu tanımı yapmıştır.

Kanser tek bir hastalık olmayıp tümör oluşumuna neden olan kontrolsüz hücre çoğalmasıyla karakterize olan neoplazinin kesin formlarını tanımlamak için kullanılır. Malign bir neoplazi, kontrolsüz hücre proliferasyonu, komşu hücreleri istila edebilme ve daha uzak bölgelere metastaz yapabilme gibi çeşitli özelliklere sahiptir. Bu özellikler aşamalı bir şekilde kazanılır ve bu süreç “tümör progresyonu” olarak isimlendirilir. Anormal hücre birikimi olan neoplazi, hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması sonucu meydana gelmektedir. Her hücre hücre siklusuna girer ve mitozu uğrayarak yavru hücrelerini oluşturur. Normal koşullarda her hücrenin belirli bir yaşam süresi vardır. Hücre gelişimi, farklılaşması, yaşlanması ve ölümü belirli bir program dahilinde gerçekleşir ve her aşama farklı gen ürünleri ile gerçekleştirilir ve kontrol edilir. Bir dokuda çoğalan hücre miktarı ile ölen hücre miktarı arasında sabit bir oran vardır. Ancak hücrenin normalin dışında çoğalması, buna karşılık ölmesi gereken hücrelerin sonsuz yaşayabilme yeteneği kazanması dengenin bozulmasına ve dolayısıyla da hücre birikimine neden olur. Tüm bu mekanizmalar, gen ürünleri olan proteinler tarafından düzenlendiğinden, bir gendeki başkalaşım ya da epigenetik olay o genin kodladığı protein ya da polipeptidin üretilmemesi, yanlış üretilmesi ya da normalden az üretilmesi ile sonuçlanır. Bunun sonucunda da ilgili proteinlerin rol aldığı mekanizmalarda normalden sapmalar ortaya çıkar(20,36,43).

Kanser hücresinin büyüme ve çoğalma süreci, meydana gelen genetik değişiklikler (onkogenler, tümör süpresör genler), konakçı faktörleri (enzim

polimorfizmi) ve tümör konakçı etkileşimi (anjiogenez, invazyon, metastaz) ile yakından ilişkilidir(15,48). Kanser, hücredeki bu temel düzenleyici mekanizmalardaki kusurlardan kaynaklandığı için, özellikle moleküler ve hücresel düzeyde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır(22).

### **2.1.2. Kanser Türleri**

Kanserin yüzden fazla değişik türü mevcuttur. Onkolojide neoplazmın potansiyel klinik davranışının değerlendirilmesine göre benign ve malign olarak ikiye ayrılır.

“Benign” tümör sitolojik ve gros özellikleri nisbeten masum yani çevredeki dokuya zarar vermeyen ve yayılmayan ve lokal cerrahi rezeksiyonla alınıp, hastanın sağkalımını etkilemeyen türüdür.

Malign tümörlerin hepsi kanserdir. Komşu yapılara invaze olup, onları harap edebilir ve uzak bölgelere yayılarak (metastaz yaparak) ölüme yol açabilir.

Benign ve malign tümörlerin ayırt edilebileceği güvenilir kriterler bulunmaktadır(69). Bu farklar dört ana başlık altında toplanabilir:

**1. Diferansiyasyon ve Anaplazi:** Benign tümörler, iyi diferansiye ve yapıları orjin aldıkları doku için tipik iken, malign tümörlerde anaplazi ile diferansiyasyonda kayıp vardır ve yapıları sıklıkla orjin aldıkları dokuya göre atipiktir.

**2. Büyüme Hızı:** Benign tümörler genellikle ilerleyici ve yavaş büyürler. Hatta bazı dönemlerde durabilir veya gerileyebilirler. Mitoz seyrek veya normaldir. Malign tümörlerde ise büyüme hızı kararsızdır. Yavaştan hızlıya doğru değişebilir. Mitoz çok sayıda ve anormal olabilir.

**3. Lokal İnvazyon:** Benign tümörler, genellikle yapışık ve iticidir. İyi sınırlı kitle, çevre dokulara invaze ve infiltre etmez. Malign tümörler ise, lokal olarak invazivdirler. Çevre normal dokuları infiltre eder, bazen yapışık ve itici görülebilirler.

**4. Metastaz:** Benign tümörlerde yoktur, fakat malign tümörlerde sıklıkla görülür. Daha büyük ve daha az diferansiye primer tümör daha sık metastaz yapar.

Gerek malign gerekse benign tümörler türedikleri hücreye göre sınıflandırılır. Kanserlerin çoğu üç ana grupta toplanabilir: Karsinomlar, sarkomlar ve lösemi / lenfomalardır. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan karsinomlar epitel hücrelerinden kaynaklanan tümörlerdir. İnsanda az görülen sarkomlar, kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokusundan gelişen solid tümörlerdir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %7'sini oluşturan lösemi ve lenfomalar ise sırasıyla kan ya da immün sistem hücrelerinden gelişir(20,36,43,69).

### **2.1.3. Kanser gelişimi:**

Karsinogenez çok basamaklı bir süreçte değişik karsinojenlerin (kimyasal, fiziksel ve viral) etkisiyle oluşan genetik ve epigenetik hasarlanmalarla gerçekleşir. Kanserde oluşan genetik değişiklikler, kromozomal düzeyde (kromozom kayıpları) ya da tek bir nükleotid düzeyinde (tek ya da multipl baz değişiklikleri) veya hiç baz değişimi olmadan metilasyon, asetilasyon gibi epigenetik mekanizmalar ile oluşabilir. Ancak karsinojene maruz kalınması hemen tümör gelişimine neden olmaz. Karsinojen tarafından başlatılan ilk başlangıç aşamasından sonra hücrenin yaşayabilme potansiyeli kazanması halinde takip eden olaylar zinciri ve yeni anomalilerin ortaya çıkması durumunda tümör gelişimi gerçekleşir(30).

Karsinogenezde ilk aşamada primer olay daha çok genetik materyaldedir ve karsinojen, dokunun stem hücre popülasyonundaki spesifik gen ya da genleri harap edebilir. Anormal çoğalmaya, tek bir hücredeki hatadan başlar, yani oluşan bir hata

yavru hücrelere de aktarılır. Çoğalma potansiyeline bağlı olarak da aynı anomaliye sahip diğer yavru hücreler gelişir. Buradan da anlaşılacağı üzere kanserde klonalite söz konusudur. Başlangıçta tümör hücreleri monoklonaldır, aynı hücreden orjin alan hücreler topluluğu şeklindedir. Fakat tümörlerin klonal olması, tümör gelişmesine neden olan hücrenin başlangıçta, kanser hücresinin bütün özelliklerine sahip olduğu anlamına gelmez. Tam tersine, kanserin gelişmesi birbirini izleyen değişiklikler sonucu giderek malign şekle dönüşen çok aşamalı bir süreçtir ve bu süreç içerisinde yeni anomaliler ortaya çıkabilir ve hücre popülasyonu poliklonal hale gelebilir.

İlk aşama çok hızlı gerçekleşebilir ancak başkalaşıma uğrayan hücre uzun süre değişmeden kalabilirler. Fakat başkalaşmış hücre değişime uğramadan latent fazda uzun süre kalabilir veya çok yavaş bölünür. Bu hücrenin hızlı bir şekilde proliferasyon olarak normal hücrelere göre baskın hale gelebilmesi için gerçekleşen başkalaşımın hücreye böyle bir potansiyel sağlaması ile ya da hücrede takip eden yeni başkalaşımın olması gerekir. Pek çok ajan hücrenin bölünmeye girmesinde etkili olur. Ancak sadece uyarıcı ajanlar tümör gelişiminde etkilidirler. Bu nedenle tümör gelişimi için hücre büyümesi gereklidir ancak yeterli değildir. Diğer faktörlerin de hücreyi etkilemesi gerekir. Normal koşullarda hücrenin, stem hücre popülasyonundan ayrılarak farklılaşması gerekir. Ancak hızla proliferasyon olan hücrelerde mekanizmaların bozulmasına bağlı olarak ilerleyen dönemlerde farklılaşma yeteneği de yitirilir. Büyümeyi hızlandıran uyarıcılar hücrelerde etkilerini gösterirken bu hücreler aynı zamanda vücuttaki normal büyümeyi inhibe eden faktörlere karşı da duyarlıdır. Dolayısıyla hücrenin geleceği, başlangıç aşamasında hücrede olan değişimin etkisi ile faktörleri arasındaki dengeye göre değişir ki bu denge preneoplastik ve hatta tamamıyla transforme olmuş tümörlerin neden gelişmeden, yaygınlaşmadan kaldığını hatta gerilediğini açıklamaktadır.

Hücresel düzeyde kanserin gelişimi, mutasyonları içeren çok aşamalı bir süreç sonucunda çoğalma, sağ kalım, invazyon ve metastaz yetenekleri giderek artan hücrelerin seçilmesi şeklinde ortaya çıkar. 'Tümör ilerlemesi' bu topluluk içindeki hücrelerde yeni mutasyonların gerçekleşmesi ile devam eder. Bu mutasyonların birçoğu hücreye daha hızlı bölünme gibi belirli avantajlar kazandırır. Böylece gerek çoğalma hızı, gerekse sağ kalım, invazyon ve metastaz yeteneği gibi daha başka özellikler için

avantaj sağladığından yeni bir hücre klonu ortaya çıkarır. Tümörler daha hızlı çoğalarak daha malign özellikler kazanırlar. Aynı zamanda kan damarları ve lenfatik kanallara da giren kanser hücreleri vücuda metastaz yapma olanağını elde eder(1,20,36).

#### **2.1.4. Kanserin nedenleri:**

Kansere yol açan maddelere karsinojen denir. Karsinojenler yapılan ayrıntılı epidemiyolojik çalışmalarla belirlenmiştir. Bir tümör gelişimi çok aşamalı bir süreçtir. Bu nedenle birçok farklı faktör kanserin oluşmasında etkili olabilir.

Kansere neden olan ajanları radyasyon, kimyasal bileşikler ve virüsler olarak genellenebilir(20). Ultraviyole ışınları, X ışınları ve  $\gamma$  ışınları mutajenik ve karsinojeniktir. Bu ışınlar DNA'yı muhtelif yönlerde zedelerler. Ultraviyole radyasyonu pirimidin dimerlerinin oluşmasına neden olabilir. Karşıt bazların eliminasyonu ile pürinsiz veya pirimidinsiz konumlar oluşabilir. Tek ve çift dal kırılmaları veya dallarda çapraz bağlantılar meydana gelebilir. Işınlama enerjisinin neden olduğu karsinojenezde temel mekanizmanın DNA hasarı olduğu varsayılmaktadır. Ayrıca DNA'daki direkt etkilerinden ayrı olarak, X ışınları ve  $\gamma$  ışınları dokularda serbest radikallerin oluşmasına neden olurlar(47).

Kimyasal bileşiklerin pek çoğu karsinojeniktir. İnsan kanserlerinin %80 kadarının başta kimyasallar olmak üzere çevresel faktörler nedeni ile meydana geldikleri belirlenmiştir. Kişinin bunlara maruz kalması, mesleğinden (benzen, asbest), beslenme alışkanlıklarından (aflatoksin), yaşam tarzından (sigara, alkol kullanımı) veya diğer nedenlerden (ilaç kullanımı) dolayı olabilir(47,20).

Sigara dumanında yüzden fazla karsinojen bulunmaktadır. Bunlardan benzopiren, dimetilnitrozamin ve nikel bileşikleri insanda kansere yol açtığı bilinen etkenlerin başında gelir. Akciğer kanserlerinin %80-90'nın tartışmasız nedeni olduğu bilinen

sigara aynı zamanda ağız boşluğu, farenks, larinks, özofagus ve daha başka organ kanserlerinde de önemli rol oynar. Sigaranın tüm kanser ölümlerinin üçte birinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir.

Bazı diğer karsinojenler mutasyon oluşturmak yerine hücre çoğalmasını uyararak kanser gelişimine zemin hazırlarlar. Çoğalma hızı yüksek hücre topluluğunun aşırı büyümesine neden olacak şekilde hücre bölünme hızını arttırdıklarından bunlara ‘tümör kamçılایıcılar’ denir. Başta östrojen olmak üzere birçok hormon bu rolü üstlenir(20).

Tümör virüsü olarak adlandırılan ve insanda kanser oluşturan virüsler Hepatit B ve C virüsleri (karaciğer kanseri), papilloma virüsleri (serviks kanseri ve diğer anogenital kanserler), Epstein-Barr virüsü (Burkitt lenfoması ve nazofarenks karsinomu), Kaposi sarkomu ile ilişkili herpes virüs ve insan T-hücre lenfotropik virüsüdür (erişkin T hücreli lösemi). Ayrıca HIV virüsü de AIDS’li hastalarda immün yetmezlik sonucunda gelişen kanserlerden dolaylı olarak sorumludur. Virüsler, hücrenin enfekte olması sonrası virüs genetik materyalinin (*v-onc*), insan hücre DNA dizisinde kendisine homolog bölgelere (*c-onc*) invaze olmasına bağlı olarak selüler gen yapısında mutasyonun oluşması şeklinde etkilidirler. Buna bağlı olarak ilgili gen ürünü hatalı kodlanmakta, farklı bir polipeptid sentezi dolayısıyla da fonksiyon değişikliği oluşmaktadır(20,36).

#### **2.1.5. Kanser hücrelerinin özellikleri:**

Normal hücrelerde oluşan başkalaşım ile uyarıların birlikte etkileşimi hücrenin tümör hücresi haline dönüşmesine neden olur. Bu değişimler, hücrenin normal fonksiyonlarının bozulması ve farklı özellikler kazanmasında etkilidirler. Tümör hücresinin bu özellikleri genel olarak aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Kanser hücrelerinin en belirgin özelliği kontrolsüz çoğalmasdır. Bu özellik, hücrenin çoğalmasını düzenleyen mekanizmaları etkileyen değişikliklerin birikmesinin sonucudur. Normal hücrelerde hücre yoğunluğunun fazla olması, hücre proliferasyonunun durdurulması için bir sinyal niteliğindedir. Ancak tümör hücrelerinde hücre yoğunluğu çok yüksek olsa dahi proliferasyon sinyalleri buna bağlı olarak da hücre bölünmesi devam eder. Tümör hücrelerinin bu in vivo özelliği in vitro koşullarda da gözlenebilir. Kültür koşulları altında normal hücre kültüründe düzgün ve sınırlı bir çoğalma gözlenirken tümör hücrelerinde düzensiz, birbirleri üzerlerine de yerleşebilen sürekli bir çoğalma söz konusudur(25).

2. Kanser hücreleri, normal hücrelere göre hücre dışı büyüme faktörlerine daha az gereksinim duyarlar. Ayrıca bazı durumlarda proliferere olabilmek için kendi büyüme faktörlerini kendileri üretirler. Hücrenin gerek duyduğu büyüme faktörlerinin kendisi tarafından salgılanması sürekli olarak çoğalmayı uyarır (Otokrin büyüme). Kanser hücrelerinin büyüme faktörlerine bağımlı olmaması, bazı durumlarda hücre içi sinyal sistemlerinde gerçekleşen anormalliklerden, örneğin, hücre çoğalmasını sağlayan sinyal yollarında görev yapan büyüme faktörü reseptörlerinin (erb B2 gibi) ya da başka proteinlerin kontrolsüz aktivitesinden kaynaklanır.

3. Normal hücrelerde hücreler arası iletişim vardır ve bu ilişki hücre bölünmesinin kontrolünde çok önemlidir. Ancak tümör hücrelerinde hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi bozulmuştur. Bölünmenin durdurulması özelliği yitirilmiştir.

4. Yüzey adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalma nedeniyle kanser hücrelerinin çoğunun tutunma yeteneği normal hücrelere kıyasla daha düşüktür. Ayrıca hücre-hücre etkileşimi açısından en önemli fark kontakt inhibisyonunda görülmektedir. Tümör hücreleri normal hücrelerden farklı olarak, komşu hücrelerle temas ettikten sonra da hareket etmeyi sürdürür, yanlarındaki hücrenin üzerine çıkar ve düzensiz, çok katlı kümeler oluştururlar.



5. Tümör hücrelerinin proteaz salgılaması: Bu özellik, tümör hücrelerinin başka doku bileşenleri ile etkileşimini değiştiren ve bu nedenle invazyon ve metastaz açısından önem taşıyan bir özelliktir. Malign hücreler; hücre dışı matris bileşenlerini parçalayan ve böylece kanser hücresinin normal komşu dokunun içine girmesine olanak veren proteazlar salgırlar.

6. Tümör hücreleri yeni kan damarlarının oluşumunu (anjyogenez) hızlandıran büyüme faktörleri salgırlar. Bu özelliği sayesinde proliferasyona giren tümör hücrelerine gerekli oksijen ve besin yeni kan damarları ile sağlanır.

7. Hücre farklılaşması yitirilmiştir. Bu farklılaşma kusuru anormal çoğalma ile yakından ilişkilidir. Kanser hücreleri normal farklılaşma programını izlemek yerine, sürekli aktif biçimde çoğalmaları ile uyumlu olarak, farklılaşmanın erken aşamalarında kalırlar.

8. Normal hücrelerde yaşanan hücreler apopitoza (programlanmış hücre ölümü) girerken tümör hücrelerinde apopitozis kaybı vardır. Apopitoz yada programlı hücre ölümü birçok hücre türünde farklılaşmanın temel öğelerindendir. Kanser hücresinin programlı hücre ölümünden etkilenmemesi tümör gelişimini önemli ölçüde hızlandırır. Kanser hücreleri apopitozdan kaçışlarına ek olarak, ökaryotik kromozomların uçlarını kısaltmaktan koruyan telomeraz enziminin ekspresyonu sayesinde, sınırsız replikasyon yeteneğine de sahiptir (20,25).

## **2.2. Kanser ve Genetik:**

Kanser klinikte görülen en yaygın ve ciddi hastalıklardan biridir. Bu güne kadar yapılan birçok istatistiksel çalışmada, kanserin toplumların yaklaşık üçte birinden fazlasında görüldüğünü, ölümlerin yüzden yirmiden fazlasından sorumlu olduğunu ve gelişmiş ülkelerin toplam sağlık harcamalarının yaklaşık yüzde onundan fazlasının kanser tedavileri harcamalarını oluşturduğunu göstermiştir.

Bütün bu veriler sonucunda kanser bütün dünya üzerinde yapılan çalışmaların odak noktası haline gelmiştir. Kanser, tedavi edilmediği zaman ölümlerle sonuçlanmaktadır. Kanserle mücadelede en önemli noktayı erken tanı oluşturmaktadır. Kansere yakalanma riski yüksek olan bireylerin kanser gelişmeden önce saptanabilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle farklı kanser türlerinin erken tanısını sağlayacak markerlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar her geçen gün artmaktadır(20,43).

Önceki bölümde normal ve tümör hücresi özellikleri karşılaştırıldığında her bir özelliğe ilgili çok sayıda protein işlev göstermektedir. Proteinler polipeptidlerden oluşmuştur ve her polipeptid bir gen tarafından kodlanır. İlgili protein sentezlenmemiş ise ya da yanlış bir protein sentezlenmiş ise veya normale göre az miktarda sentez gerçekleşmiş ise o proteinin oluşumunda etkili gen ya da genlerde bir başkalaşım söz konusudur. Bugüne kadar elde edilen veriler, karsinogenez sürecinde farklı türlerde genlerin etkili olduğunu göstermiştir ki bu genler:

- Hücre çoğalmasında hücrelerarası sinyal iletiminde rol oynayan proteinleri kodlayan genler
- Mitotik siklus düzenleyicilerini kodlayan genler
- Apoptozis elemanlarını kodlayan genler
- Kontakt inhibisyon oluşumunda etkili elemanları kodlayan genler
- Hasarlı DNA tamirinden sorumlu proteinleri kodlayan genler

Farklı kanser tiplerinin oluşumundan sorumlu moleküler patolojiler değerlendirildiğinde genel olarak yukarıda maddeler halinde belirtilen mekanizmalarda etkili gen gruplarında başkalaşım dikkati çekmektedir. Bu veriler “bir kanserin sporadik olaylardan dolayı bireyde izlenmesine ya da herediter bir özellik göstererek bir ailenin bazı bireylerinde tekrar etmesine bakılmaksızın kanser genetik orijini olan bir hastalıktır” varsayımını doğrular niteliktedir(20,43).

Kanserde etkili olduğu düşünölen tüm genler birlikte değerdendirildiğinde 3 ana grup altında toplanırlar(28,38,43):

1. Onkogenler
2. Tümör Baskılayıcı Genler
3. DNA Tamir Genleri

Hücre proliferasyonu, direkt ya da indirekt olarak kontrol edilir. Hücre siklusu G1, S, G2 ve M fazlarından oluşur. G1 fazı DNA sentezinin gerçekteştiği S fazına, G2 fazı ise mitoz bölünmeye (M fazına) hazırlık evreleridir (5). Bu döngüde hücrenin bölünmeye girebilmesini belirleyen kontrol noktaları bulunmaktadır ve kontrol noktaları bir sonraki evreye geçiše izin verir ya da vermez. Her iki kontrolde de normal regülatör gen ürünleri, hücre sayısının artırılması ya da hücre sayısı artışının inhibe edilmesine göre gruplandırılır. Dolayısıyla kanserin tipik özellikleri olan kontrolsüz hücre proliferasyonu ve invaze olabilme yeteneğini belirleyen iki başkalaşıma açık nokta bulunmaktadır.

Birincisi, uyarılan geni aşırı aktif hale getirir. Bu başkalaşım dominant özelliكتedir, yani genin her iki alelinden sadece birinde oluşan başkalaşım bile o genin aşırı aktif hale gelmesi için yeterlidir. Bu başkalaşıma uğrayan gen onkogen olarak isimlendirilir. Onkogenlerin normal formları protoonkogen adını alır ve her normal hücrede hücre ileti sisteminde görev alan genlerdir.

İkincisi ise hücre çoğalmasını inhibe edici geni inaktif hale getiren başkalaşımdır. Bu başkalaşım resesif özelliكتedir, yani genin her iki alelinde de mutasyon olması gerekir. Bu genler tümör baskılayıcı genler olarak ifade edilirler. Normal hücrelerde hücre çoğalması kararını vermek amacıyla görev yaparlar(20,43,69).

### **2.2.1. Onkogenlerin aktivasyonu:**

Onkogenlerin kanser gelişimindeki rolü 60'lı yıllardan itibaren ortaya konmuştur. Onkogenler genomda aktif olarak bulunan protoonkogenlerin mutant formlarıdır. Bugüne kadar 80 den fazla protoonkogen saptanmış olup her birinin onkogenik potansiyel göstererek farklı kanserlerin oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir(43).

Protoonkogenler, nükleer transkripsiyon faktörleri, hücre siklusunu kontrol eden proteinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve reseptörlerinin regülasyonunda önemli rol oynayan genler olup yapılarında, meydana gelen genetik değişiklikler sonucunda onkogenik aktivasyon kazanırlar. Bir başka deyişle protoonkogenler, hücrenin sosyal davranışlarını düzenleyen mekanizmalarda görev alan elemanları kodlarlar. Bir hücrenin komşusundan gelen sinyaller hücreyi bölünmeye, farklılaşmaya ya da ölmeye yönlendirir. İşte protoonkogenler, ekstraselüler ortamdan gelen sinyalleri alarak hücre içerisinde bu sinyalin nükleusta DNAYA kadar ulaşmasını sağlayan olaylar zincirinde rol alan proteinleri kodlarlar. Protoonkogen ürün listesinde hücre sinyal ileti sisteminde görev alan her tip molekül bulunmaktadır (salgılanan proteinler, transmembran proteinler, GTP-bağlayan proteinler, proteinkinazlar, transkripsiyon faktörleri gibi). Bu moleküller, normal koşullarda hücre gereksinimi olduğu zaman kompleks zincirler halinde sinyalleri alıp nükleusta DNAYA kadar iletilirler. Ancak başkalaşım durumunda başkalaşımın olduğu gen görevini yapamayacağı için devamlı olarak sinyali bir sonraki zincir halkasına aktarmakta ve bu da hücre proliferasyonunun devamlı gerçekleşmesine neden olmaktadır(20,43).

Protoonkogenlerin onkogenik potansiyel kazanmasına neden olan mekanizmalar 3 ana grupta toplanabilir:

1. Delesyon ya da Nokta mutasyonları,
2. Gen amplifikasyonu
3. Kromozom translokasyonları

### **2.2.2. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu:**

Tümör baskılayıcı genlerin aktivitesine ilişkin ilk bilgiler Henry Haris ve ark. tarafından 1969 da başlatılan somatik hücre hibridizasyon deneylerinde elde edilmiştir. Normal hücrelerin tümör hücreleri ile füzyonu sonucu oluşan hibrid hücrelerde her iki ebeveyne ait kromozomlar vardır. Ancak çoğu hücre deney hayvanlarında herhangi bir tümör oluşturamamıştır ki bunun nedeni, normal hücreden orjin alan genlerin tümör gelişimini baskılamalarıdır. Tümör baskılayıcı genlerin tümör gelişimindeki mekanizmalarına ilişkin ilk bilgiler 1971 de Knudson(33) tarafından ortaya atılmıştır. Bugün “Knudson Hipotezi” veya “iki vuruş” hipotezi olarak ifade edilen bu görüşte tümör baskılayıcı genin kontrolsüz hücre proliferasyonunu kontrol etme ve inhibe etme yeteneği vardır. Bu yetenek ancak ilgili genin her iki alelinde de başkalaşım olması durumunda kaybolur. Tümör baskılayıcı gen kontrol etme fonksiyonunu kaybeder.

Tümör baskılayıcı genler hücre siklusunu kontrol ederek ya da hasarlı hücreleri apoptozise yönlendirerek hücre proliferasyonunu inhibe ederler. Ailesel geçiş gösteren kanserlerde ilk vuruş parental eşey hücrelerinde tümör baskılayıcı genin bir alelinin mutasyona uğraması, ikinci vuruş da diğer alelin farklı mekanizmalar ile somatik mutasyonudur (60,33). Bu durum aynı zamanda heterozigosite kaybı (Loss of Heterozygosity = LOH) olarak da ifade edilmektedir. Bir aleli mutant diğer aleli de normal olan bireyde diğer alelin de mutant olması heterozigot mutant durumdan homozigot mutanta geçişi ifade eder ki bu da ilgili tümör baskılayıcı genin fonksiyonunu yitirmesi demektir. Mitotik non-disjunction, tüm kromozomun kaybı, delesyon ve somatik rekombinasyon LOH’a sebep olan mekanizmalar arasındadır (42,63).

### **2.2.3. Hücre döngüsünün kontrolünde rol oynayan proteinler:**

Hücre döngüsünün kontrolünde fosforilasyonun rolü büyüktür. Fosforilasyonda siklinler, siklin bağımlı serin/threonin protein kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz

inhibitörleri (CDI) görev almaktadır. CDK'lar yalnız başlarına bulduklarında inaktiftirler ve siklin'e bağlandıklarında aktive olurlar. Oluşan bu siklin-CDK kompleksinin regülatör kısmı siklinden katalitik kısmı CDK'dan oluşur. CDK'lar hücre siklusunu kontrolünde rol oynayan substratlarını fosforilleyerek aktive ederler. Siklinler (A,B1,D,E) hücre döngüsünün çeşitli evrelerinde sentezlenir ve yıkılırlar. D tipi siklinler (D1,2ve3) hücre döngüsünün başlamasında rol oynarlar. Ayrıca büyüme faktörleri ve mutajenlere yanıt olarak da eksprese edilirler. Bu siklinler CDK4 ve 6'yı regüle ederler ve mutajen ortamdan ayrıldığında yıkılırlar. Siklin E, CDK2'yi regüle ederek hücrenin S fazına girmesini sağlar. Siklin A S fazında sentezlenir ve anafazda yıkılır. Siklin B1 sentezi S fazının sonunda başlar ve G2'den M' e geçilirken pik yapar. Siklin B'lerin anafazda yıkılmasıyla hücre siklusunu tamamlanır. CDK'ları defosforile ederek kontrol eden bir başka regülatör de CDI'lerdir. CDI'ler (p15, p18, p19, p21, P27) ya siklinlere ya CDK'lara ya da Siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK'ları inhibe ederler. Hücre döngüsünün kontrolünde yer alan bu proteinlerin kontrolsüz ekspresyonu ya da hiç eksprese edilmemesi kontrolsüz hücre bölünmesine dolayısıyla kansere neden olmaktadır(5,19).

#### **2.2.4. DNA tamir mekanizmasında yer alan genlerdeki değişiklikler**

DNA çok çeşitli kimyasal reaksiyonlardan geçer. DNA hücre genomunun kalıcı kopyası olduğu için yapısındaki değişiklikler, diğer hücre komponentleri olan RNA ya da proteinlere göre çok daha önemli sonuçlara neden olur. Başkalaşım, DNA replikasyonu sırasında yanlış bazların DNA ya katılması nedeniyle oluşur. Ayrıca DNA da spontan veya kimyasal ajanlara, radyasyona maruz kalma durumunda da çeşitli kimyasal değişiklikler ortaya çıkar. Hücre genomunun bütünlüğünün korunabilmesi için hücreler harap olan DNA'yı tamir etmek için mekanizmalar geliştirmek durumundadırlar. Bu DNA tamir mekanizmaları iki ana gruba ayrılır:

1. DNA harabiyetinden sorumlu kimyasal reaksiyonun direkt olarak önlenmesi
2. Harap olan bazların DNA'dan çıkarılması

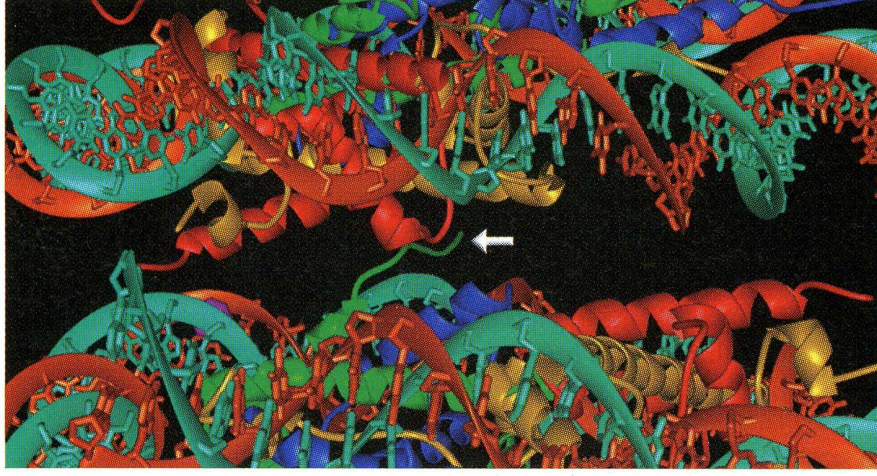
İşte DNA'ların yukarıda belirtilen yollar ile tamir edilmesinden sorumlu olan genler DNA tamir genleridir. Farklı mekanizmalarda görev alan farklı tamir genleri bulunmaktadır(20,43).

DNA tamir genleri tümör baskılayıcı genlerden *p53*'ün DNA'da hata olduğunun saptanmasına bağlı olarak eksprese olurlar. Bu genlerde başkalaşımın olması ilgili genin tamir işini gerçekleştirememesine neden olmakta, DNA tamiri olmadığı için yavru hücreye hatalı DNA aktarımı ile sonuçlanmaktadır ki, kanserde bu durum son derece önemlidir. Örneğin kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser gelişiminin %50 kadarındaki moleküler patoloji, yanlış-eşleşme tamirinden sorumlu genlerdeki başkalaşımın nedeniyle tamirin gerçekleşmemesidir(31).

#### **2.2.5. Kromatin yapısının transkripsiyonla ilişkisi**

Aktivatör ve baskılayıcıların ikisi de, ökaryotlarda transkripsiyonu, yalnız transkripsiyon sisteminin diğer bileşenleri ile etkileşerek değil kromatin yapısındaki değişikliklerle de düzenlerler. Ökaryot hücre DNA'sı nükleus içerisinde çıplak DNA olarak bulunmaz, histonlarla sıkıca bağlıdır. Kromatinin temel yapısal birimi nükleozomdur. Nükleozom, H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının her birinden ikişer adet içeren molekülün etrafına sarılmış 146 baz çiftlik DNA ile, nükleozom çekirdek partikülüne eklenen, DNA'ya bağlı bir histon H1 molekülünden oluşur(20,43). Kromatin daha sonra, büyük DNA ilmikleri oluşturmak üzere, üst düzey dolanmalarla, daha ileri düzeyde yoğunlaşır. Ökaryotik DNA'nın kromatine paketlenmesi, transkripsiyon için kalıp olarak kullanılabilme koşullarını önemli ölçüde etkilediğinden, kromatin yapısı, ökaryot hücrelerde gen ekspresyonunun önemli bir yönüdür. Aktif olarak transkribe edilen genler, büyük olasılıkla kromatin iplik yapısındaki göreceli olarak daha az yoğun kromatinde bulunur. Bununla birlikte, aktif olarak kopyalanan genler, nükleozomda paketlenmiş olarak histonlara bağlı kaldığından, transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz, kromatin ile etkileşimde çıplak DNA'ya göre daha fazla problemle karşılaşılırlar. DNA'nın nükleozom çekirdek partikülü etrafında sıkıca dolanmış olması hem transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanabilmesini hem de

RNA polimerazın kromatin kaplı kalıptan transkripsiyonunu etkilediği için, transkripsiyon için başlı başına önemli bir engelidir(20,43).



Şekil 2.2.5.1: Asetilasyon ve kromatin oluşum ilişkisi.

Şekil 2.2.5.1’de okla belirtilen histon 4 kuyruğu bir nükleozomu diğer nükleozoma bağlayabilir. Böylece kompakt kromatin yapısı buna bağlı olarak da transkripsiyonun baskılanması sözkonusudur. Ancak kuyruk kısmındaki spesifik bir amino asitin asetillenmesi sonucu nükleozom-nükleozom bağlantısı engellenir. Böylece kompakt kromatin yapısı oluşmaz ve transkripsiyon gerçekleşir.

Birçok hücre tipinde, histon asetillenmesi, transkripsiyonel olarak aktif kromatinle ilgilidir. Çekirdek histonlar, iki işlevsel bölge içerirler; biri histon-kıvrım bölgesi olup, diğer histonlarla etkileşimde ve DNA’nın nükleozom çekirdek partikülünün çevresinde dolanmasında görevlidir ve diğeri, amino ucu kuyruk bölgesidir ve nükleozomdan dışarı uzar. Amino ucu kuyruk bölgeleri lizince zengindir ve özgün lizinlerin asetillenmesiyle değiştirilebilir. Asetillenme, histonların net pozitif yükünü azaltır ve hem DNA’ya bağlanmasını hem de diğer proteinlerle etkileşimini zayıflatabilir. Ayrıca histonların asetillenmesinin, nükleozomal DNA’ya transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını



kolaylaştırdığı gösterilmiştir ve bu histonların asetillenmesinin DNA'ya bağlanan proteinlerin, kromatine ulaşılabilirliğini artırdığını göstermektedir.

Histonlar sadece asetillenerek değil, serin birimlerinin fosfatlanması, lizin ve arjininin metillenmesi ve lizinlere ubükitin eklenmesiyle de modifiye olurlar(20,43).

### **2.3. DNA Metillenmesi:**

Epigenetik, herhangi bir gen / genom mutasyonu olmamasına rağmen gen ekspresyonundaki kalıtsal ya da sporadik değişimlerle ilgilenen bilimsel disiplin olarak tanımlanabilir. Hücre siklusu sırasında dinamik değişimler söz konusudur. Epigenetik değişimler aşağıdaki gibi gruplandırılabilir:

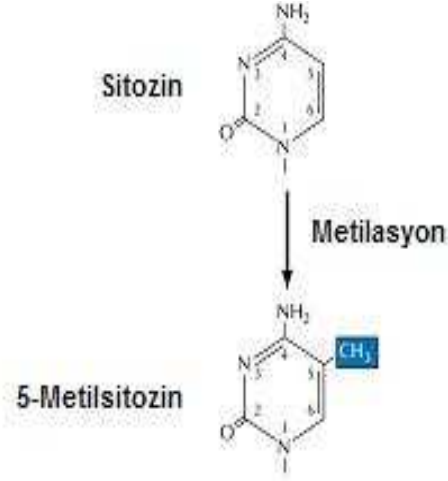
#### **DNA metilasyonu: DNA düzeyinde**

- 1.DNA metiltransferaz
- 2.Metil CpG bağlanan proteinler

#### **Histon modifikasyonları: Nükleozom düzeyinde**

1. Merkez histon proteinlerinde translasyon sonrası modifikasyonlar
2. Asetilasyon, metilasyon ve fosforilasyon
- 3.Enzimler : Histon asetiltransferaz, histon deasetilaz

DNA'nın metillenmesi, omurgalılarda transkripsiyonun kontrolünde kromatin yapısı ile ilişkili genel bir mekanizmadır. Omurgalı DNA'sındaki sitozin birimleri, 5-karbon pozisyonuna metil gruplarının takılmasıyla modifiye edilebilir (Şekil 2.3.1). DNA'nın tek dalında bulunan CpG dinükleotidlerinde sitozinin 5-karbonuna bağlanması ile metillenme gerçekleşir. Bu işlem DNA Metiltransferazlar ile olmaktadır. Bu metillenme, promotörlerin çevresinde yüksek sıklıkta CpG dinükleotidi içeren genlerin transkripsiyonel aktivitelerinin azaltılması ile ilişkilidir(20).



Şekil 2.3.1: Sitozinin metillenerek 5-metilsitozinin oluşumu

DNA metillendiğinde 5-metilsitozin oluşur. Bu metillenme CpG dinükleotidlerinde ve DNA'nın major oluşunda meydana gelir. Burada nükleotid değişimi yoktur. Sadece bağ ilişkisinde değişim söz konusudur (epigenetik değişim).

CpG'lerin genomdaki dağılımları rastgele değildir. Genomda nadiren dağınık CpG dinükleotidleri görülür. Bazı doku spesifik genlerde, housekeeping genlerin promoter bölgelerinde lokalize, 26.000-45.000 civarında CpG adaları olduğu tahmin edilmektedir(20,43,69).

İnsanlarda 2 tür CpG dinükleotid dizisi vardır:

1. Dağınık halde bulunan, düşük frekansta metilli
2. Adacıklar halde bulunanlar

Normalde genin promoter bölgesindeki CpG adacıklarındaki sitozinler metilli değilken 3' bölgesindeki tekrarlayan CpG'ler metilli olarak bulunurlar. Memeli genomunda, %5 sitozin metillidir. DNA metilasyonu normal koşullarda selüler farklılaşmada rol oynayan önemli bir mekanizmadır. Hücreler arasında genom aynı

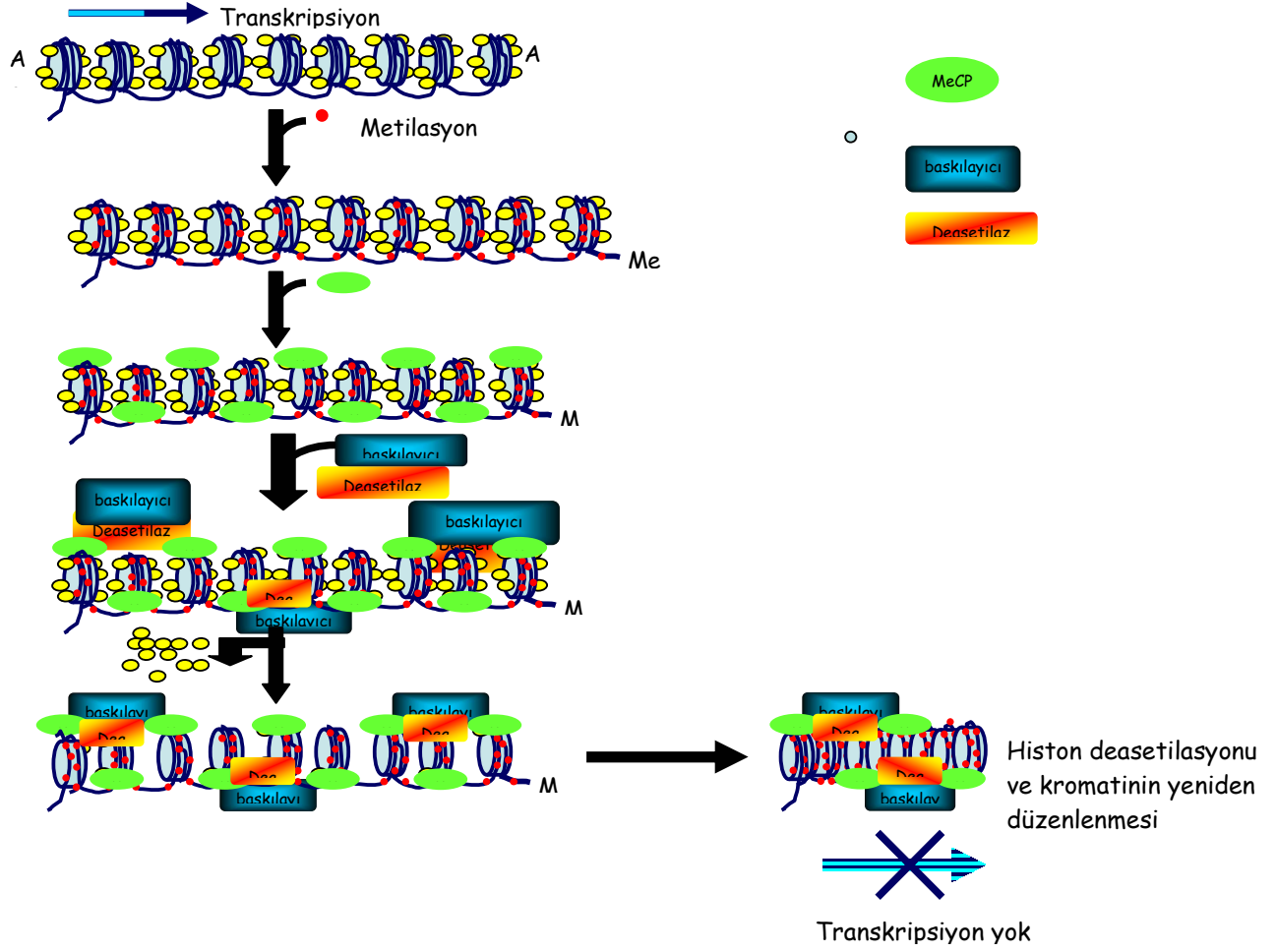
olmasına rağmen farklı hücre gruplarında doku spesifik genlerin eksprese olmasında DNA metilasyonu etkili olmaktadır. Diğer bir deyişle DNA metilasyonu genomda genin eksprese olmaması gereken bölgelerde, kodlanmayan bölgelerde transkripsiyon sürecini durdurur. Örneğin heterokromatin yoğun metilasyonun görüldüğü bir yapıdır. Bu kromatin yapısının olduğu bölgelerde DNA replikasyonu geç olmakta, transkripsiyon ise gerçekleşmemektedir. DNA metilasyonunun aynı zamanda viral sekans kontaminasyonunun önlenmesi, tekrarlayan sekanslar arasına giren transpozonların etkisiz hale getirilmesinde de etkili olduğu düşünülmektedir.

Erişkin dokularda CpG adacıklarındaki DNA metilasyonu aracılığıyla gen ekspresyonunu baskılama görevi 2 küçük gen grubu ile sınırlıdır:

- a. İnaktif X kromozomundaki CpG adacıklarının yaygın metillenmesi.
- b. İmprint genlerde, eksprese olmayan alelin inaktivasyonu promoterdeki metilasyonla ilişkilidir (20,43).

Metillenme, genlerin transkripsiyonunu, hem bazı transkripsiyonel aktivatörlerin bağlanmasını engelleyerek, hem de metillenmiş DNA'ya özgül olarak bağlanan baskılayıcıların katılımını sağlayarak engeller. Metillenen DNA'ya bağlanan baskılayıcılar, histon deasetilazlar ile kompleks oluşturarak çalışır ve DNA metillenmesini, histon asetilasyonu ve nükleozom yapısındaki değişimlerle ilişkilendirir. Genellikle, gen aktivitesi ve metilasyon arasında ters bir ilişki vardır.

Transkripsiyona uğrayabilecek, aktif DNA, histonlar asetillenmiş, metile olmamış DNA iken, baskılanmış (sessiz) DNA ise histonlar asetillenmemiş, metillenmiş DNA'dır. Sekil 2.3.2 de de görüldüğü üzere histon asetilasyonu histonlardaki (+) yükün kaybolmasına, histon-DNA arasındaki çekimin azalmasına, DNA'nin serbestleşmesine ve böylece transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasına neden olur. Ancak CpG adacıklarının metillenmesi ve histon deasetilasyonu ile histonlar (+) yük kazanırlar ve DNA-histon ilişkisi kompakt bir yapı oluşturur. Bu durumda da transkripsiyon inhibe olur.



Şekil 2.3.2: Gen ekspresyonunda metilasyon ve asetilasyon ilişkisi

DNA metillenmesi, transkripsiyonu engelleyebilmesine karşın genellikle önceden baskılanmış olan genlerin metillendiği görülür. DNA metillenmesi, transkripsiyon inaktivasyonunun primer nedeni olmaktan çok temel olarak gelişim sürecinde gen inaktivasyonunun sürekliliğinde ve korunmasında katkı sağlar.

DNA'nın metillenmesi DNA Metiltransferaz enzimleri ile olmaktadır. DNA Metiltransferaz enziminin yapısını inceleyecek olursak, bugün için DNA metiltransferazların 3'ü iyi tanımlanmıştır: (20,43)

**Dnmt1:** Kalıcı metilazdır. bölünmesi sırasında oluşan yeni DNA sentezi sonrası eski DNA metilasyon paternini korumakla görevli, replikasyon bölgesine lokalizedir.

**Dnmt 3A ve 3B:** de novo metilasyondan sorumludurlar. Normal metiltransferaz aktivitesi gösterdiklerine inanılmaktadır. Dnmt1' in aksine hemi-metilli DNA' ya karşı bir eğilimleri yoktur. Dnmt3 ailesi, benzer katalitik domain içerirler. Fakat regülatuar domainleri farklıdır.

DNA metillenmesinin önemli bir düzenleyici rolü, memeli embriyosunun gelişiminde yer alan bazı genlerin ekspresyonunu denetleyen ve genomik damgalanma olarak bilinen fenomende tanımlanmıştır. Diploid hücrelerde, genellikle, bir genin hem anne kökenli hem de baba kökenli allelleri eksprese olur. Bununla birlikte, ekspresyonları anneden veya babadan kalıtımlarına bağlı olan birkaç damgalanmış gen vardır. Bazı durumlarda, damgalanmış genin sadece baba kökenli alleli eksprese olur ve anne kökenli allel inaktiftir. Damgalanmış diğer bazı genlerde anne kökenli allel eksprese olurken, baba kökenli allel inaktiftir(20,43,69).

DNA metillenmesi, damgalanmış genlerin anne kökenli ve baba kökenli alleller arasındaki ayırmda anahtar rolü oynar. H-19 geni bu konuda iyi bir örnektir. H-19 geni, erkeğin germ hücrelerinin gelişimi sırasında spesifik olarak metillenirken dişide metillenmez. Bu nedenle, döllenme ile yumurta ve spermin birleşmesi, genin metilenmiş olduğu baba kökenli allele ve metillenmemiş anne kökenli allele sahip bir embriyo ürünü verir.

#### **2.4. DNA Metilasyonu ve Kanseri:**

Kanser ile ilişkili olarak DNA metilasyonu üzerindeki çalışmalar, 80'li yılların başında, onkogen aktivasyonu üzerine kurgulanan projelerle başlamıştır. O tarihten itibaren, kanser oluşumunda metilasyonun rolünün anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu çalışmalarda temel araştırma konusu, kanser hücrelerinde metilasyonun artıp artmadığı olmuştur. Araştırmalarda elde edilen sonuçlar metilasyon

profilinin, spesifik genlere göre, incelenen genlerin farklı bölgelerinde, özellikle promoter bölgelerinde değişebildiğini göstermiştir(49,50,51).

1983 yılında Feinberg ve Vogelstein, onkogenlerin yeniden düzenlenmesi ve mutasyonlarını araştırırken, kanser hücrelerinde genel bir hipometilasyon olduğunu, bu durumun da onkogen aktivasyonunda rol oynayabileceğini ortaya koymuşlardır(20).

Kanser hücreleri genellikle hipometiledir. Bu, enzimatik metodlarla ya da HPLC yöntemiyle, total 5-metilsitozin miktarına bakılarak gösterilmiştir. Metilden yoksun diyetle beslenen fare ve ratlarda, DNA hipometilasyonu olduğu ve sonucunda karaciğer kanserinin geliştiği bildirilmiştir(43).

DNA hipometilasyonu, kromozomal yeniden düzenlenmeleri ve artan delesyon oranına yol açar, bunun sonucunda da artan somatik instabilite oranı görülür. Bu konuda ki çalışmalar devam etmektedir.

Bununla birlikte kanserin türüne göre değişmek üzere başta tümör baskılayıcı ve DNA tamir genleri olmak üzere bazı spesifik genlerin özellikle promoter bölgelerinde metilasyon profilinde bir artış olduğu da birçok çalışmada gösterilmiştir(3,65,72,73).

Her bir CpG adacık analizinde artan metilasyon paternleri saptanmıştır. Geniş çaplı CpG adacık analizini sağlayan PCR orjinli yöntemlerin uygulanmasıyla, bir tümördeki yüzlerce hatta binlerce CpG adacığının normalin dışında artmış metilasyon paterni gösterdikleri ortaya konmuştur. DNA metiltransferaz enzim aktivitesinde de artış söz konusudur(20,43).

CpG Adalarının hipermetilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin ve DNA tamir genlerinin inaktivasyonuna yol açtığı gibi; DNA'daki hipometilasyon da kromozom instabilitesi, retrotranspozan aktivasyonu ve onkogen aktivasyonu yolu ile kanser gelişiminde önemli rol oynar.

Örnek olarak *GSTPI*(Glutasyon S Transferaz Pi) genini örnek gösterebiliriz. Bu gen, DNA harabiyetine yol açan elektrofillerin detoksifikasyonundan sorumludur. Prostat Tm'lerinin %90' ından fazlasında bu genin ekspresyonunda anlamlı bir azalma söz konusudur ve bu azalmanın %95'ininden fazlasında neden, promotor hipermetilasyonudur (74).

Yapılan çalışmalardan elde edilen verilerde akla gelen ilk soru, kanserdeki genel hipometilasyonun mu, yoksa spesifik bazı genlerin hipermetilasyonunun mu kanserin gerçek sebebi olduğudur. Bu sorunun cevabı kanser etyolojisinin aydınlatılması ve dolayısıyla kansere yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından da önem taşımaktadır(10).

Karsinogenez, ister tümör baskılayıcı genlerdeki inaktivasyona, ister onkogen aktivasyonuna bağlı gelişsin karsinogenezis sürecindeki bir sonraki aşama DNA'da meydana gelen genel bir hipometilasyondur. Bu durum, kanserin prognozunu, yayılımını ve agresif karakterinin dozunu tayin eden DNA instabilitesi, kromozomal kırık ve kayıplara neden olur. İşte bu kritik aşamada devreye girecek olan DNA tamir genlerinin fonksiyonlarında meydana gelebilecek bir azalma hastalığın seyrini dramatikleştirebilir(20,50,51).

Çalışmalar sonucunda ortak kanı, CpG adalarının metilasyonunun tümör gelişiminin özellikle erken dönemlerinde önemli olduğu, kanser için bir nevi zemin hazırladığı, kanserin prognoz ve yayılım hızına etki ettiği yönündedir. Bu durum, bir tümör markeri olarak metilasyonun önemini vurgulamaktadır. Bu doğrultuda kanserdeki CpG adalarının metilasyon profilini inceleyen çalışmalardan elde edilecek veriler ile kanserin erken tanısı, tümör klasifikasyonu, hastalığın prognozu, tedavi protokollerinin düzenlenmesi, tedaviye yanıtın kontrolü ve kanserden korunma yolları konularına ışık tutulabilir(49,50,51).

Kanser olgularında tümör markeri olarak DNA metilasyonunun incelenmesinin mutasyonlara göre bir avantajı da, metilasyonun genin her zaman belirli bir bölgesinde

oluşması ve PCR teknikleri ile metilasyon anomalilerinin kolaylıkla incelenebilmesidir(51).

## **2.5. Akciğer Kanseri**

Akciğer kanseri, tüm dünyada mortalitesi en yüksek kanser türüdür ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedenleri arasında üst sıralarda yer almaktadır(68). Amerika'da 2006 yılında 160.000'den fazla sayıda insan akciğer kanserinin başta geldiği kanserler nedeniyle yaşamını yitirmiştir(29). Ülkemizde resmi rakamlara göre her yıl 20 bin- 25 bin yeni akciğer kanseri ortaya çıkmakta ve bu rakamın 30 bin-40 bin' e kadar ulaşabileceği düşünülmektedir. Ülkemizde akciğer kanserleri erkeklerde daha sık görülmektedir(71).

### **2.5.1. Akciğer kanseri için risk faktörleri**

Toplumda sık görülmesi, çok ölümcül olması ve en çok sosyal ekonomik kayba neden olması nedeniyle akciğer kanseri bir halk sağlığı problemidir(71).

Yaş, bütün kanserlerde olduğu gibi akciğer kanserinde de önde gelen risk faktörlerinden bir tanesidir. 65 yaş ve üzerinde kanser sıklığı artmaktadır. Yaşı 65 üzerinde olan kişilerde kanser gelişme riski on kat daha fazladır. Akciğer kanserlerinin ancak %5-10 kadarı genç erişkinlerde görülür ve genellikle ailesel öyküye bağlanmaktadır.

Akciğer kanserinin başlıca nedeni sigaradır. Tüm akciğer kanserlerinin %80-90'ı tek başına sigaraya bağlıdır. Akciğer kanseri oluşumu ile günlük içilen sigara sayısı arasında bir bağlantı olduğu gibi, bu kanserden ölüm riski sigaraya başlama yaşı, kullanım süresi, her gün içilen sigara sayısı ve sigaradaki katran yoğunluğu ile bağlantılıdır. Katran oranı az veya filtreli sigaralar ile hastalığın bağlantıları açısından



farklılıklar olup olmadığı konusunda yeterli bilgimiz olmamakla beraber, her ikisinin ölüm riskini azalttığı konusunda açıklamalar vardır(71,72).

Meslekle ilgili akciğer kanseri yapıcı maddelerin önde gelenleri arasında arsenik, asbest, eter, krom, nikel ve vinil klorit vardır. Bazı ön görülere göre, akciğer kanserlerinin mesleki nedenlerle oluşma oranı %20'lere kadar yükselmektedir. Sigara kullanılmasının bu kişilerde akciğer kanserine yakalanma riskini 90 kat arttırabileceği ileri sürülmüştür. Meslek bağlantılı akciğer kanserleri için, asbest ve kömür ocaklarındaki ilişki, deneysel ve yaygınlık aşamalı yapılmış çalışmalar sonunda ortaya konulmuştur(71).

Beslenmenin rolü tartışılmakla beraber kesin bulgu ve bilgiler ortaya konamamıştır. Koruyucu rolü olanlar içinde taze sebze ve meyvelerdeki anti-oksidan maddeler ve karoten ihtiva eden yiyecekler gündemdedir. Risk nedeni olarak kolestrol ve yağ oranı yüksek yiyeceklere işaret edilmektedir.

Çevresel radon maruziyetinin de akciğer kanseri gelişimi ile ilişkili olabileceği, coğrafi olarak akciğer kanseri yüksekliğine yol açabileceği bilinmektedir.

Ailede akciğer kanseri olması akciğer kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır. Ailede akciğer kanseri olan ve hiç sigara içmemiş bir kadının akciğer kanseri riski 2,8 kat artmış iken; ailede akciğer kanseri olmayan ve sigara içen bir kadında bu risk 11,3 kat artmıştır; ailede akciğer kanseri olan ve sigara içen bir kadında ise bu riskin 30 kat arttığı gösterilmiştir (70,71,72).

### **2.5.2. Akciğer kanserinin belirtileri**

Akciğer kanseri başlangıçta genel şikayetlerle başlamaktadır. Hastalığın semptomlarının iyi bilinmesi erken tanı açısından yarar sağlamaktadır. En sık görülen belirtileri, öksürük, göğüs ağrısı, hemoptizi, nefes darlığı, hırıltılı solunum, boyun ve yüzde şişlik, iştahsızlık, kilo kaybı, halsizlik, ateş ve gece terlemesidir.

Akciğer kanserinin akciğer dışı belirtileri, tümörün diğer organlara metastazlarına bağlı olabildiği gibi tümörden salınan bazı immünolojik ve hormonal maddelere bağlı da olabilir. Metastaz belirtileri organa özgü olup örneğin kemik metastazlarında ağrı, beyin metastazında bilinç bozukluğu, kasılmalarla seyreden nöbet, görme bozuklukları olabilir. Metastaz belirtilerinin dışında iştahsızlık, kilo kaybı, kuvvet kaybı, halsizlik, ateş gibi şikayetler olguların birçoğunda görülebilir. Ayrıca özellikle küçük hücreli akciğer kanserinde tümörden salınan bazı hormonal maddelere bağlı olarak parmaklarda çomaklaşma, deri lezyonları, nörolojik tablolar, kan tablosunda bozulma gibi bulgular olabilir(36).

### **2.5.3. Akciğer kanserinin tipleri**

Primer akciğer tümörlerinin %95'i bronşial epitelden kaynaklanır (bronkojenik karsinomlar). Kalan %5'i içinde bronşial karsinoidler, mezoteliomalar, bronşial gland neoplazmları, mezenkimal malignensiler (fibrosarkomlar, leiomyomalar), lenfomalar ve birkaç benign lezyon bulunur. En sık görülen benign lezyon küçük (3-4 cm), küresel hamartomlardır.

Başlıca dört histolojik tipte bronkojenik karsinoma vardır. Bunlar:

1. Squamöz hücreli,
2. Adenokarsinoma,
3. Büyük hücreli indifferansiye karsinoma
4. Küçük hücreli karsinoma

Günümüzde tedavi açısından değerlendirme yapılırken ilk 3 tip bir kategoriye sokulup “ Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinomu”(KHOAK) diye adlandırılır. Bu şekilde “ Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu”(KHAK) bu gruptan ayrılmış olur(36).

#### **2.5.4. Küçük hücreli akciğer kanserleri**

Erkeklerde kadınlara oranla daha sık olup, sigara içimi ile çok yakın ilgileri vardır. Soluk gri renkte, santral lokalizasyonda kitleler olup, hiler ve mediastinal lenf nodlarını erken fazda tutarlar. Bu kanserler, küçük, oval-yuvarlak, lenfosit benzeri ve çok mitoz gösteren hücrelerden meydana gelmiştir. Bu klasik yulaf hücreli (oat cell) kanserdir. KHAK'lar hızlı büyüyen, geniş infiltrasyon yapan ve erken yayılan lezyonlardır ve nadiren rezektü edilebilir durumda yakalanırlar. Bu nedenle hemen her zaman kombine radyoterapi ve kemoterapi ile tedavi edilirler. İki yıllık sağ kalım oranı %5-8 dolayındadır(36,71,72).

#### **2.5.5. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri**

Squamöz hücreli karsinoma, erkeklerde daha sık görülmekle birlikte, özellikle sigara içenlerde görülmektedir. Büyük bronşların santralinden çıkmaya meyillidir, lokal hiler lenf nodlarına kolay yayılır fakat toraks dışına diğer akciğer tümörlerinde olduğundan daha geç yayılırlar. Squamöz karsinoma, bronş epitelinde yıllar önce başlayan bir metaplazi veya displazi izleyen in-situ karsinomdan sonra ortaya çıkar. Squamöz hücreli karsinomlar, metastaz yapmadan önce büyük ve bronşları tıkayan semptomatik kitle yaptıklarından diğer tiplere göre hafifçe daha iyi bir prognoza sahiptir. Tanı konulduğunda genellikle cerrahi olarak çıkarılabilir durumdadırlar.

Adenokarsinomlar, tüm KHOAK içinde %30-35 oranında görülmektedir. Erkek ve kadında görülme sıklığı eşittir. Santral yerleşimli olabileceği gibi, çoğunlukla periferik yerleşimlidir. Periferik akciğer skarları ile ilgili olarak ortaya çıkar. Adenokarsinomlar, yavaş büyürler ve daha küçük kitle yaparlar. Ayrıca diğer subtiplere göre daha erken safhada metastaz yaparlar. Bronchiolo alveolar karsinoma (BAC), özel bir adenokarsinoma tipidir. İki çeşidi vardır. BAC'ın yarısından azı multifokal müsinöz tümörlerdir. Bazen tek başlarına kitle yaparlar, bazen de birbirleri ile birleşen kitleler oluştururlar. BAC'ın prognozu diğer bronkojenik karsinomlara göre daha iyidir.

Büyük hücreli karsinomalar; sitolojik diferansiyasyon göstermeyen belki de squamöz veya glandüler neoplazmların, herhangi bir kategoriye giremeyecek kadar, indifferensiye şeklindedir. Tümör bazen vahşi bir anaplazi gösteren dev hücrelerden oluşmuştur. Erken fazda uzak yerlere yayılma eğiliminden dolayı kötü prognozlu dururlar. Yarısından fazlasında tanı konduğu zaman beyin metastazı vardır ve 5 yıllık yaşama oranı %2-3 dür(36,70,71,72).

### **2.5.6. Akciğer kanserinde evrelendirme**

Kanserde evreleme hastalığın seyri ve uygulanacak tedavi yönteminin belirlenmesi açısından son derece önemlidir ve mutlaka yapılması gerekir.

KHOAK'da evreleme TNM sistemine göre yapılır. Bu sistemde T ile tümör boyutu, tümörün komşu doku ve organlarla ilişkisi, tümörün bronkoskopik görünümü gibi birçok özelliği tanımlanırken, N tümöre ait bölgesel veya uzak lenf bezlerindeki metastaz varlığını ya da yokluğunu tanımlar. M uzak organ metastazları ile ilişkili olup, M1 olarak tanımlanan olgular yani uzak organ metastazı saptanan olgular doğrudan başka bir incelemeye gerek olmaksızın evre IV olarak sınıflandırılır. TNM sistemine göre akciğer kanseri olguları evre I-IV olarak ele alınır. Evre I ve II, erken evre akciğer kanseri olarak tanımlanır ve bu tür olgularda mutlaka cerrahi tedavi olanakları araştırılmalıdır.

Amerikan Kanser Birliği (AJCC) ve Uluslararası Kanser Mücadele Birliği (UICC), akciğer kanseri için TNM evrelendirme klasifikasyonunu, 1997 yılında modifiye edilmiş şekli Tablo 2.5.6.1'de gösterilmektedir(36).

Tablo 2.5.6.1: Akciğer Kanserlerinde Yeni Uluslararası TNM Sistemi

<p><b>PRİMER TÜMÖR (T)</b> T0: Primer Tümör saptanmaması. Tx: Radyolojik ve bronkoskopik olarak saptanamayan fakat bronkopulmoner sekresyonlarda malign hücre bulunması. Tıs: İn situ karsinom T1: En büyük çapı 3 cm veya daha az olan, akciğer parankimi veya visceral plevra ile çevrilmiş tümör. Bronkoskopik olarak lob bronşunun proximaline invazyon olmaması. T2: 3 cm den büyük tümör veya herhangi büyüklükteki bir tümörün visceral plevraya yayılması veya hiler bölgeye kadar genişleyen atelektazi ve obstrüktif pnömoniye neden olması. Bronkoskopik tetkikte, karinadan en az 2 cm daha uzakta olan tümör. T3: Herhangi büyüklükteki tümörün, göğüs duvarı (Superiör sulcus tümörü dahil), diyafragma,mediastinal plevra,parietal perikarda yayılması veya tüm akciğeri kapsayan atelektazi ve obstrüktif pnömoniye neden olması veya bronkoskopik tetkikte karinaya 2 cm'den daha az mesafede fakat karinaya yayılmamış olması. T4: Herhangi büyüklükteki tümörün mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, özofagus, vertebra ve karinaya yayılması veya malign plevra ve perikard sıvısı saptanması veya akciğerin aynı lobunda birden fazla neoplastik nodül bulunması.</p> <p><b>NODAL TUTULUM (N)</b> N0: Rejyonal lenf nodlarında metastaz olmaması. N1: Aynı taraf peribronşial ve/veya hiler lenf bezlerinde metastaz veya direkt yayılım mevcut. N2: Aynı taraf mediastinal ve/veya subcarinal lenf bezlerinde metastaz olması. N3: Karşı taraf hiler veya mediastinal lenf bezlerinde metastaz saptanması, aynı taraf veya karşı taraf skalen veya subraklavikuler lenf bezlerinde metastaz mevcut.</p> <p><b>UZAK METASTAZ (M)</b> M0: Uzak metastazın olmaması M1: Uzak metastaz mevcut.</p>
--

#### **2.5.6.1. Evre grupları**

"Occult" karsinom (TxN0M0), bronkopulmoner sekresyonlarda malign hücreler belirlenmiş, fakat tümör radyolojik ve bronkoskopik olarak gösterilememiştir. Evreleme grupları ve özellikleri Tablo 2.5.6.1.1'de gösterilmektedir.

Tablo 2.5.6.1.1: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserinde Evre Grupları.

Evre	Tx	Nx	Mx
Occult carcinoma	x	?	?
Stage 0 (Karsinoma İn situ)	IS	0	0
Stage IA	1	0	0
Stage IB	2	0	0
Stage IIA	1	1	0
Stage IIB	2	1	0
	3	0	0
Stage IIIA	3	1	0
	1-3	2	0
Stage IIIB	herhangi N	3	0
	4	herhangi T	0
Stage IV	herhangi T	herhangi N	1

## **2.6. Akciğer Kanseri ve DNA Metilasyonu**

Son yıllarda yapılan çalışmalarda akciğer kanserlerinin çok erken evrelerinde kan ve balgam gibi biyolojik sıvılarda metile DNA sekanslarının saptanabileceği belirtilmiştir(44,51).

Akciğer kanserleriyle ilişkilendirilmiş genlerden 3 veya daha fazlasında metilasyon saptanması durumunda akciğer kanseri gelişme riskinin %64 spesivite ve sensivite ile 6,5 kat arttığı ortaya koyulmuştur(44).

Safar ve arkadaşlarının(49) 180 KHOAK hastasında yaptıkları çalışmada akciğer kanseri için erken sayılabilecek N0 olan hastalarda %67'ye varan bir oranda *E-cadherin*, *APC*, *p16*, *MGMT*, *hMLH1*, *RASSF1A*, *DAPK*, *ATM* genlerinden en az birinde hipermetilasyon olduğunu belirlemişlerdir.

Etseller ve arkadaşlarının(11) 2001 yılında yaptıkları geniş kapsamlı bir çalışmada birçok kanser türünde *p14*, *p15*, *p16*, *p73*, *APC* ve *BRCA1* gibi tümör baskılayıcı genler, *hMLH1*, *GSTP1* ve *MGMT* gibi DNA tamir genleri, *CDH1*, *TIMP3* ve *DAPK* gibi

invazyon ve metastazda etkili olan genlerin metilasyon profillerini araştırmış ve çok değerli veriler elde etmişlerdir. Buna göre akciğer kanserlerinde en sık metilasyon saptanan gen %31 ile *p16* olmuştur. Ancak Kim ve arkadaşlarının(35) 2005 yılında KHOAK’li hastalarda yaptıkları bir başka çalışmada da *BRCA1* geninde saptanan hipermetilasyonun *p16* geninin homozigot delesyonu ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Bu bilgiler akciğer kanserlerinde metilasyon profilini inceleyecek çalışmaların geniş kapsamlı ve çok yönlü planlanması gereğini ortaya koymaktadır. şöyle ki, çalışılacak materyalin alındığı lokalizasyon, alındığı zaman kadar, çalışılacak genlerin sayısı ve çalışma yöntemi de irdelenmelidir. Ayrıca metilasyon çalışmaları ile beraber ekspresyon ve diğer moleküler yöntemlerde kombine edilmelidir.

Gen mutasyonlarının aksine DNA metilasyonu geri dnebiyen bir süreçtir ki buda onu kanser tedavisinde önemli bir yere yerleştirir. Myelodisplastik sendrom tedavisinde kullanılan ve sağ kalımı arttırdığı gösterilen *azacitidine* (Vidaza) aslında bir DNA metilasyon inhibitörüdür. Ancak bu ilacın akciğer kanserlerinde nasıl bir etkisi olacağı bilinmemektedir. Histon deasetilasyonu gen ekspresyonunu baskılayan başka bir epigenetik mekanizmadır. *Suberoylanilide hidoksamik asit* ve *depsipeptit* gibi histon deasetilasyonunu engelleyen ilaçlarda akciğer kanserlerinin tedavisi için tartışılmaktadır(51).

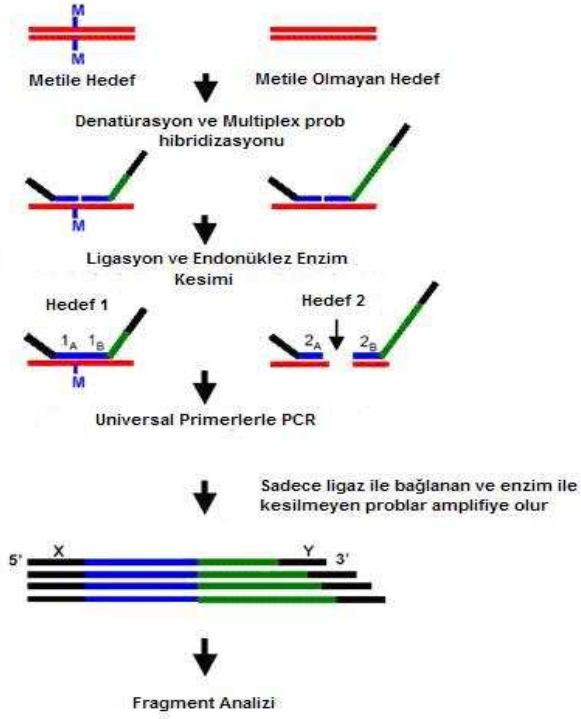
### **2.7. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi**

Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemini ilk defa 2002 yılında Schouten ve arkadaşları tanımlamışlar ve son haliyle relatif kantitatif PCR yöntemi olarak tariflemişlerdir(71).

Metilasyon spesifik MLPA (MS-MLPA); 24 taneye kadar spesifik dizinin, metilasyon profilinin değerlendirilebildiği yeni bir metodur. Amplifikasyon ürünleri bir kapiller elektroforez cihazı ile ayrıştırılır. Sadece bir tek primer çifti kullanılır. Oluşan fragment uzunlukları 130-490 bp arasında olduğundan jel paternine uygundur. Elde edilen sonuçların kontrol örneğiyle karşılaştırılması sonucunda hangi dizinin metile olduğu tespit edilir. MLPA reaksiyonunda yaklaşık 24 dizinin metilasyon araştırması için sadece 20 ng insan DNA'sı yeterli olmaktadır. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında MS-MLPA reaksiyonu daha hızlı, ucuz ve uygulanması kolaydır. Gerekli ekipmanlar ise çoğu moleküler laboratuvarında bulunabilmektedir(70).

Tekniğe; kolay uygulanabilir, üretken, sensitif olması ve doğru multipleks analiz sonucu verebilmesi için birçok modifikasyon yapılmıştır. Her bir MLPA probu hedef diziye hibridize olduklarında birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid içerir. Bu iki farklı oligonükleotid uygun şartlarda ligaz enzimi ile birbirlerine bağlanır. MS-MLPA'da ligasyon işlemi ile birlikte aynı hasta örneğinin yarısı da HhaI metilasyon spesifik enzimi ile kesime uğratılır. Şekil 2.7.1'de MS-MLPA yöntemin basamakları ve çalışma prensibi gösterilmiştir. Bütün bağlanmış problar 5' ve 3' uçlarında PCR ile sadece tek primer çifti kullanılarak aynı anda amplifiye olmaları için tanımlayıcı dizilere sahiptirler. Her prob uzunlukları 130 ve 480 baz çifti arasında değişmek üzere birbirinden farklı uzunlukta amplifikasyon ürünü verir. Her MLPA probunun iki oligonükleotid parçasından bir tanesi kimyasal olarak sentezlenmiştir ve 5' ucunda PCR ile amplifikasyon için sabit bir dizi ve 3' ucunda hedefe spesifik olan dizi bulunur. Probu diğer oligonükleotidi 5' ucunda 25-43 nükleotid uzunluğunda ve ilk oligonükleotide komşu şekilde hedef diziye hibridize olan diziyi içerir, 3' ucunda ise PCR ile amplifikasyonda kullanılacak olan sabit dizi ve 19-370 nükleotid uzunluğunda dolgu dizisi bulunur. 80-440 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotidler MLPA kalitesini karşılayacak şekilde ticari olarak bulunmadıklarından kimyasal olarak sentezlenmiştir(70).





Şekil 2.7.1: MS-MLPA yönteminin basamakları ve çalışma prensibi

Hibridizasyon, ligasyon ve enzim kesim aşamalarından sonra PCR ile amplifikasyonda bütün probler için tek çift primer kullanılmaktadır. Primerlerden bir tanesi FAM [N- (3- fluoranthyl) maleimide] ile işaretlenmiştir. Bu sayede birçok farklı gen ve bölgesinin metilasyon profili tek bir reaksiyonda değerlendirilebilir(68). Çalışmamızda kullanılacak olan SALSA MS-MLPA ME001B tumor suppressor probemix içinde mevcut olan kontrol probaları ve incelenecek genlere ait problemlerin listesi Tablo 2.7.1’de verilmiştir.

Tablo 2.7.1: SALSA MS-MLPA ME001B tumor suppressor probemix içinde mevcut olan kontrol problemleri ve incelenecek genlere ait problemlerin listesi

Uzunluk(bp)	SALSA MLPA prob	Hha1 bölgesi	Gen	Kromozomal pozisyon
64-70-76-82	DQ-control fragments			
88-92-96	DD-control fragments			
136	Probe 0981-L0566		CREM	10p12.1
142	Probe 2255-L3752	+	TIMP3	22q12.3
148	Probe 2065-L1586	+	APC	5q21
154	Probe 3366-L2750		PARK2	6q25.2-q27
160	Probe 1524-L1744	+	CDKN2A	9p21
166	Probe 1686-L1266	+	MLH1	3p21.3
175	Probe 0554-L0123		TNFRSF1A	12p13
184	Probe 4044-L3849	+	ATM	11q22.3
193	Probe 4040-L1698	+	RARB	3p24
202	Probe 1245-L0793		MLH3	14q24.3
211	Probe 0607-L0591	+	CDKN2B	9p21
220	Probe 3804-L0949	+	HIC1	17p13.3
229	Probe 2334-L1820		PAH	12q23
238	Probe 3813-L3753	+	CHFR	12q24.33
247	Probe 5162-L4543	+	BRCA1	17q21
256	Probe 0587-L0382		BCL2	18q21.3
265	Probe 2761-L2210	+	CASP8	2q33-q34
274***	Probe 7949-L7730	+	CDKN1B	12p13.1
283	Probe 1832-L1397		TSC2	16p13.3
292	Probe 2203-L8261	+	PTEN	10q23.31
301	Probe 4042-L3755	+	BRCA2	13q12
310	Probe 3184-L2523		CDK6	7q21.3
319	Probe 3817-L1731	+	CD44	11p13
328	Probe 2248-L1734	+	RASSF1	3p21.3
337	Probe 2416-L1862		CDH1	16q22.1
346	Probe 1677-L1257	+	DAPK1	9q34.1
355	Probe 3810-L1211	+	VHL	3p26-p25
364	Probe 1234-L0781		AI651963	10p14
373	Probe 2202-L1700	+	ESR1	6q25.1
382	Probe 3807-L2159	+	RASSF1	3p21.3
391	Probe 0713-L0108		KLK3	19q13
400	Probe 4050-L1263	+	TP73	1p36
409	Probe 2201-L1699	+	FHIT	3p14.2
418	Probe 1617-L1199		BRCA2	13q12.3
427	Probe 3819-L3848	+	IGSF4	11q23
436	Probe 7946-L7727	+	CDH13	16q24.2
445	Probe 0678-L0124		TNFRSF7	12p13
454	Probe 1638-L1176	+	GSTP1	11q13
463	Probe 2260-L1747	+	MLH1	03p21.3
472	Probe 3984-L3251		CTNNB1	03p22
481	Probe 2683-L2148		CASR	3q13.3-q21

### **2.7.1. Akciğer kanserinde MLPA tekniğinin kullanımı**

Çalışmamızda Türkiye’de yeni bir yöntem olan Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) tekniği ile KHOAK’li vakalarda şimdiye kadar kanser etyolojisinde çalışılmış 24 genin metilasyon profilleri araştırıldı.

Bugüne kadar yapıp, literatürde yayınlanmış MLPA tekniği ile ilgili birçok yayın olmasına karşın, MS-MLPA ile ilgili akciğer kanserine yönelik bir çalışma yayınlanmamıştır. Yaptığımız akciğer kanserine yönelik MS-MLPA tekniğinin kullanıldığı çalışmamız bu bakımdan bir ilk olma özelliğindedir.

Çalışmada kullanılan ME001-MLPA probmiks kit ile belirli tümör baskılayıcı genler, bazı DNA tamir genleri ve metastaz ve invazyondan sorumlu bazı genlerin metilasyon profilleri incelenmiştir. Araştırmamızda bu tanımlı genlerdeki delesyon veya amplifikasyonlar değil, sadece mevcut metilasyon varlığı incelenmiştir. Çünkü üretici firmanın dizayn ettiği kitteki spesifik prob bölgeleri, genlerin genellikle promoter bölgelerine yöneliktir. Bu yüzden genin genel olarak amplifikasyonu veya delesyonundan bahsetmek güvenilir bir veri oluşturmayacaktır.

Bu çalışmada amaçlanan, akciğer kanseri tanısı almış hastaların tümör dokuları ile histopatolojik açıdan normal olarak değerlendirilen çevre dokuların DNA örneklerinde metilasyona spesifik MLPA (MS-MLPA) tekniği ile akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiş 24 farklı genin promoter bölgelerindeki CpG adacıklarının metilasyon paternleri açısından değerlendirilmesidir. Çalışmadan çıkan sonuçlar son yıllarda hız kazanan, kanserin erken tanısında çeşitli tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonunun biyomarker olarak kullanımı çalışmalarına da ışık tutacaktır.

### **3. GEREK VE YÖNTEMLER**

#### **3.1. Gereçler**

##### **3.1.1. Materyal seçimi**

İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesinde, histopatolojik olarak incelenerek “küçük hücreli olmayan akciğer kanseri” tanısı almış 100 olgu çalışmaya alınmıştır. Olgulara ait %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş, parafin bloklara gömülü dokulardan hazırlanmış (FFPT) ve hematoksilin-eozin ile boyanmış arşiv preparatları, yeniden WHO kriterlerine göre gradelendirilmiş ve TNM sınıflamasına göre evrelendirilmiştir. Her hastaya ait doku örneklerinden kanser dokusu içeren 5 mikronluk kesitlerden elde edilen DNA örnekleri çalışma grubu olarak, aynı hastaya ait kanser dokusu içermeyen kesitlerden elde edilen DNA örnekleri de kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. Olguların yaşları, cinsiyetleri, biyopsi şekli, takip aralıkları, rekürrens ve/veya progresyon durumları hastalara ait patoloji raporları, hasta dosyalarından temin edilmiştir. Her MS-MLPA analizinde sağlıklı olduğu bilinen sigara içmeyen, ailesinde kanser öyküsü olmayan, bilinen bir kanserojen maruziyeti olmayan dört bireyin periferik kanından elde edilen DNA örnekleri internal kontrol olarak çalışmaya dahil edildi.

##### **3.1.2. Kullanılan gereçler**

Spektrofotometre (Eppendorf)

Kapiller Elektroforez Cihazı (ABI Prizm 310)

Manga Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu (Roche)

Spektrofotometre Küvetleri (Eppendorf)

Mikro Pipet takımı (Gilson)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

Thermal cycler (Gold 96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)

Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)

Elektroforez aleti (Consort E844)  
Mikrodalga fırın (Arçelik)  
Su banyosu (Nüve)  
Etüv (Friocell MMM Med Center)  
Vorteks (Heidolph)  
Deep-freeze (Meraeus)  
Buzdolabı (Arçelik)  
Santrifüj tüpleri  
Ependorf Tüpü (1,5 ml lik)  
PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)  
ABI 310 yükleme tüpleri (ABI)  
ABI 310 47 cm Kapiller (ABI)

### **3.1.3. Kullanılan kimyasal malzemeler**

DNA Ekstraksiyon Kiti (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I)  
Salsa MLPA ME001 Probe Mix (MRC Holland)  
Performans Optimize Edici Polimer 4 (POP4 TM) (ABI)  
10X EDTA lı Buffer (ABI)  
Gene Scan 500 Rox Internal Size Standart (ABI)  
Hi-Di Formamide (ABI)  
Mineral Yağ (Roche)  
Hha1 Restriksiyon enzimi (Sigma)  
Ksilol (Merk-1.08685.2500)  
Doku Parçalayıcı Tampon (MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer)(Roche-Lot:  
13562000)  
Etanol (95%) (Tekel)  
6X Jel yükleme tamponu (Sigma)  
Agoroz (Sigma-Lot: 072K0059)  
Etidyum Bromid (Sigma)  
Proteinaz K (QIAGEN)  
Distile Su

## **3.2. Yöntemler**

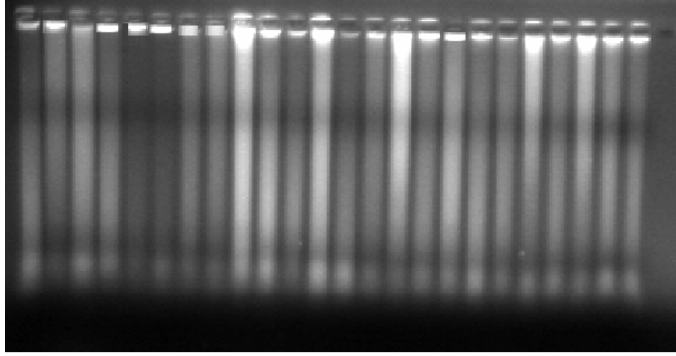
### **3.2.1. Magna Pure Compact DNA ekstraksiyon robotu ile parafine gömülü dokudan DNA elde etme protokolü**

Çalışmamızda tümör dokusu ve tümör hücresi içermeyen çevre akciğer dokusu örneklerini içeren parafinize kesitlerden DNA izolasyonunda Safar ve arkadaşları(50) tarafından bildirilen yöntem laboratuvar koşullarımıza göre modifiye edilerek uygulandı. Modifiye edilen bu yöntem aşağıda basamaklar halinde belirtilmiştir.

1. Parafinli dokudan 10 µm'lik kesitler alındı ve ependorf tüpü içerisine konuldu.
2. İçinde kesit bulunan ependorf tüpüne 1200 µl ksilol eklendi. 15 saniye vorteks yapıldı. Örnekler 70<sup>0</sup> C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dakika bekletildi. Hızlı devirde (14000 rpm) 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı atılıp aynı işlem iki defa daha tekrarlandı.
3. Pelet üzerine süzölmüş %100'lük etanoldan 1200 µl konularak 70<sup>0</sup> C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dakika bekletildi. Daha sonra hafifçe vorteks yapıldı.
4. 3 dakika tam devirde santrifüj yapılarak süpernatantı atıldı.
5. Alınabildiği kadar alkol uzaklaştırılıp etüvde 20 dakika kurutuldu.
6. 180 µl buffer ATL + 20 µl Proteinaz K konularak vorteks yapıldı, 56<sup>0</sup> C 'de çalkalamalı su banyosunda bir gece bekletildi.
7. İnkübasyon sonunda örnekler vortekslenerek 8000 rpm'ye ayarlanmış santrifüjde 2 dakika santrifüj edildi.
8. Süpernatantlar alınarak ayrı bir tüpe aktarıldı.
9. İlk tüpteki peletin üzerine tekrar 180 µl buffer ATL + 20 µl Proteinaz K konularak vorteks yapıldı, 56<sup>0</sup> C 'de çalkalamalı su banyosunda bir saat bekletildi.
10. Su banyosundan alınan örnekler örnekler vortekslenerek 8000 rpm' ye ayarlanmış santrifüjde 2 dakika santrifüj edildi.
11. Süpernatantlar daha önce aktarılan süpernatantlarla birleştirildi.

12. Elde edilen örnekler Magna Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu'na uygun ekstraksiyon protokolü ayarlanarak yüklendi.

Elde edilen DNA örnekleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi.



Şekil 3.2.1.1: Örnek DNA'lara ait %1'lik agaroz jel görüntüsü

### **3.2.2. İzole edilen DNA örneklerinin MLPA yöntemiyle analizi**

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

### **3.2.2.1. DNA denatürasyonu ve SALSA ME001B Probe Miks ile hibridizasyonu**

- Örneklerimizden elde ettiğimiz DNA dan 5 µl (20-250 ng DNA) alındı.
- Alınan örnekler 200 µl lik PCR strip tüplerine aktarıldı.
- 98 °C de 5 dk. Thermal Cyler cihazında bekletilerek DNA nın denatürasyonu sağlandı.
- Sonrasında örnekler 25 °C ye soğutuldu.
- 25 °C deki DNA örneğinin üzerine 1.5 µl SALSA Probe Mix (ME001) ve 1.5 µl MLPA Buffer ilave edilip pipetaj ile homojenize edildi.
- Sonraki aşamada buharlaşmayı önlemek için PCR strip tüplerinin üzerine 5 µl mineral yağ eklendi.
- Daha sonra 95 °C de 1 dk. inkübe edilip örnekler 60 °C de 16 saat hibridizasyona bırakıldı.

### **3.2.2.2. Ligasyon ve enzim kesim reaksiyonu**

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

- Hibridizasyon süresi bitiminde termal cyler cihazının ısısı 54 °C ye indirildi.
- Örnekler 54 °C ye geldikten sonra strip tüplerden mineral yağ dikkatli şekilde pipet ile alındı.
- Hibridizasyon ürününe 3µl Ligaz-Buffer A ve 10µl su ilave edildi ve pipetajla karıştırıldı.
- Bu karışımın 10µl'si başka bir stribe alınarak aynı DNA'lardan ikinci bir seri oluşturuldu..
- Tüm stripler en az 1 dakika 49 °C'de bekletildi.
- İlk seri stiplere 49 °C'de 10µl Ligaz 65 karışımı ilave edildi.



- İkinci seri striplere yine 49 °C'de 10µl içinde Hha1 enziminin de olduğu Ligaz-Kesim karışımı ilave edildi.
- 49°C de 30 dk. inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra 98 °C de 5 dk. bekletilerek ligaz inaktivasyonu sağlandı.

**Ligaz 65 Karışımı:** Her örnek için 1,5µl Ligase 65 Buffer B, 8,25µl su, 0,25µl Ligase 65 enziminin karıştırılmasıyla hazırlandı.

**Ligaz-Kesim Karışımı:** Her örnek için, 5µl Ligase 65 Buffer B, 7,75µl su, 0,25µl Ligase 65 ve 0,5µl Hha1 enziminin (10 ünite/µl) karıştırılmasıyla hazırlandı.

### **3.2.2.3. PCR**

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

- Ligasyon ve enzim kesim reaksiyonu ürününden 5 µl alınarak ayrı PCR strip tüplerine aktarıldı.
- Daha sonra ligasyon ve enzim kesim ürünü konmuş her strip tüpüne sırasıyla:
  - 2 µl 10XSALSA PCR Buffer
  - 13 µl distile su
  - 5 µl Polimeraz miks,

konularak PCR başlatıldı.

-PCR şartları:

Denatürasyon	30 sn	95 °C	} 38 döngü
Annealing	30 sn	60 °C	
Ekstansiyon	60 sn	72 °C	
Final Ekstansiyon	20 dk	72 °C	

#### **3.2.2.4. ABI 310 cihazına yükleme**

Amplifikasyonu gerçekleşen örnekler fragment analizi için aşağıdaki protokolle kapiller jel elektroforez cihazına yüklendi.

- PCR bitiminde elde edilen ürünlerden 3 µl alınarak ABI 310 cihazı yükleme tüplerine aktarıldı.
- Daha sonra üzerlerine:
  - 0.5 µl internal size standart (Rox 500)
  - 12 µl deiyonize formamid konularak pipetajla homojenize edildi.
  - Örnekler 94 °C de 4 dk Thermal Cycler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlandı.
  - Devamında örnekler buz üzerine alındı.
  - ABI 310 cihazında; 15 kV de 5 saniye injeksiyon zamanı, 60 °C ve 15 kV de 25 dakika yürütme zamanı, filtre C şartları sağlandı.
  - Daha sonrasında örnekler ABI 310 cihazına yüklenilerek, Gene Mapper programında okutulmaya başlandı.
  - Her örneğe ait pik görüntüleri elde edildi.

#### **3.2.2.5. Değerlendirme**

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

MS-MLPA yönteminde hasta değerlendirme şekli diğer MLPA problemlerine göre farklılıklar göstermektedir: Normal MLPA çalışmalarının değerlendirmesinde, hastalara ait DNA'lardan elde edilen pik alanlarının diğer sağlıklı kontrollere ait pik alanlarıyla

karşılaştırılması büyük önem taşır. MS-MLPA'da ise pik alan ve büyüklüğü değil, pikin varlığı ya da yokluğunun belirlenmesi yeterli olmaktadır. MSMLPA çalışmasında örnekler iki gruba ayrıldı. Bir grupta normal MLPA reaksiyonu gerçekleştirilirken diğerinde metilasyona duyarlı enzim reaksiyonu gerçekleştirildi. Çalışmanın sonucunda bir örneğe ait iki ayrı reaksiyondan elde edilen ürünlere ait pik görüntüsü elde edildi. Çalışmamızda metilasyon değerlendirilmesi hedeflendiği için enzim ile kesimi yapılmış örneklerle ait pikler analiz edildi. Ancak yöntemin kendi içinde oluşturduğu internal kontrol basamağı olarak ilk etapda enzim ile kesime tabi tutulmamış örneklerle ait pikler incelenerek, araştırılacak genlerin, prob bölgelerinin varlığı kontrol edildi. Bu kontrol sonrasında herhangi bir pik kaybı olmayan örnekler ile ikinci aşamaya geçildi.

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

## **4. BULGULAR**

İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesinde, histopatolojik olarak incelenerek “küçük hücreli olmayan akciğer kanseri” tanısı almış 100 olgu çalışmaya alındı. Olgulara ait %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş, parafin bloklara gömülü dokulardan hazırlanmış (FFPT) ve hematoxilen-eozin ile boyanmış arşiv preparatları, yeniden WHO kriterlerine göre ve TNM sınıflamasına göre evrelendirildi. Her hastaya ait doku örneklerinden kanser dokusu içeren 5 mikronluk kesitlerden elde edilen DNA örnekleri çalışma grubu olarak, aynı hastaya ait kanser dokusu içermeyen kesitlerden elde edilen DNA örnekleri de erken evre değişimleri değerlendirmek üzere çalışmaya alındı. Olguların yaşları, cinsiyetleri, biyopsi şekli, takip aralıkları, rekürrens ve/veya progresyon durumları hastalara ait patoloji raporları, hasta dosyalarından temin edildi.

### **4.1. Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik ve Klinik Özellikleri:**

Çalışma grubumuza dahil edilen hastaların 32’si kadın, 68’i erkek olup, yaş ortalaması  $58,98 \pm 3,4$  olarak saptandı. Hastaların %90’ında sigara kullanımı öyküsü mevcuttu. Hastalar ayrıca ailelerindeki kanser öyküsü açısından da değerlendirildi.

Tablo 4.1.1: Hastaların yaş gruplarına göre dağılımları.

Yaş	N	%
<39	4	4,0
40-49	18	18,0
50-59-	28	28,0
60-69	22	22,0
70+	28	28,0
Toplam	100	100,0

Tablo 4.1.2: Hastaların ailelerinde kanser öyküsü varlığı dağılımı.

<b>Ailede Kanser Öyküsü</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Var	26	26,0
Yok	74	74,0
Toplam	100	100,0

Çalışmamızda yer alan küçük hücre dışı akciğer kanseri tanısı almış vakalar histopatolojik olarak, 46 (%46)'sı squamöz hücreli, 54 (%54)'ü de adenokarsinom şeklinde değerlendirilmiştir. Bu vakaların grade ve TNM sınıflarına göre dağılımları Tablo 4.1.3'de belirtilmiştir. Bu dağılımlara göre vakaların %86'sı Grade III, TNM sınıflaması kriterlerine göre sınıflandırıldığında ise %32 oranında T3N1M0 sınıfı ile uyumlu olduğu görüldü.

Tablo 4.1.3: Hastaların histopatolojik tanılarına göre dağılımları

<b>Histopatolojik Tanı</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Squamöz	46	46,0
Adenokarsinom	54	54,0
Toplam	100	100,0

Tablo 4.1.4: Hastaların Grade'lerine göre dağılımları

<b>Evre</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Grade I	2	2,0
Grade II	12	12,0
Grade III	86	86,0
Toplam	100	100,0

Tablo 4.1.5: Hastaların TNM sınıflamasına göre dağılımları

TNM Sınıflaması	n	%
T3N1M0	32	32,0
T2N1M0	26	26,0
T2N0M0	10	10,0
T3N0M0	10	10,0
T4N1M0	6	6,0
T2N2M0	4	4,0
T4N0M0	4	4,0
T3N2M0	2	2,0
T3N2M1	2	2,0
T2N0M1	2	2,0
T4N2M0	2	2,0
Toplam	100	100,0

#### **4.2. Araştırma Grubu Bireyleri MLPA Bulguları:**

Çalışma grubuna alınan hastaların parafin dokulara gömülü doku örneklerinde elde edilen DNA örneklerinde 24 farklı gene ilişkin metilasyon paternleri ME001 Tümör Süpressör kiti kullanılarak MLPA yöntemi ile çalışıldı. Çalışmada ABI 310 cihazına yüklenen örnekler, Genemapper V.3.7 programı kullanılarak incelendi. Bu programda elde edilen piklerin büyüklükleri ve metilasyon pikleri varlığı kontrol örneklerinden elde edilen pikler ile karşılaştırıldı.

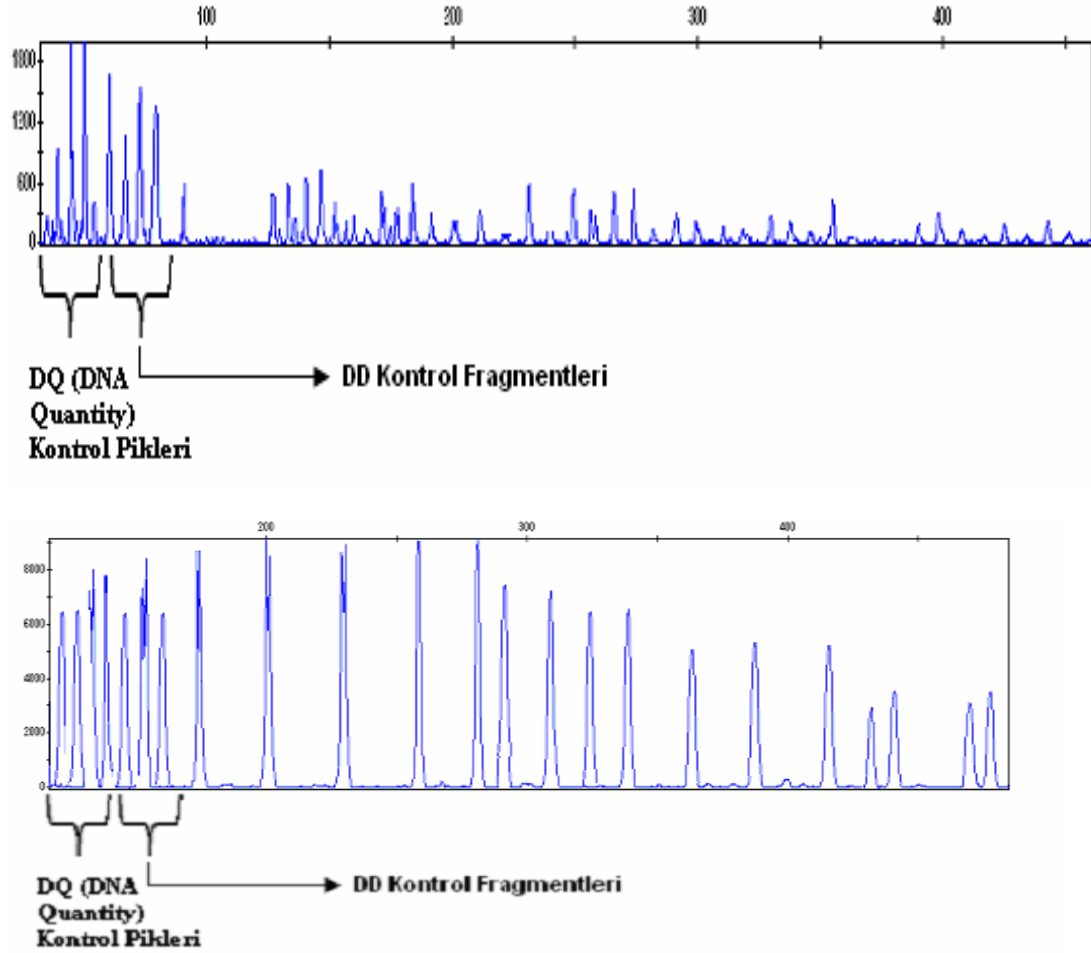
#### **4.2.1. DNA miktarının yeterliliğinin belirlenmesi**

Genemapper programında elde edilen piklerin boyutu öncelikli olarak DNA miktarıyla orantılıdır. Başarılı bir MLPA analizi için 50-500 ng DNA gereklidir. Kaliteli ve yeterli miktarda (50- 500 ng) DNA elde edilemeyen örneklerde pikler düşük ve non-spesifiktir. Çalışmaya alınan tümöral doku ve sağlam çevre doku örneklerinde, ilk değerlendirmelerinde, örneklerin %66'sında yeterli DNA miktarına bağlı olarak kaliteli pikler elde edilirken, kalan örneklerde ise değerlendirilebilecek düzeyde pikler elde edilemedi. Bu örneklerde tekrar MLPA PCR reaksiyonları tekrarlanarak analizler için uygun pikler elde edildi. MLPA yönteminde kullanılan DNA miktarının düzeyi, prob piklerinin başlangıcında yer alan DQ (DNA Quantity) fragmentlerine göre yapıldı. DQ fragment pikleri 64, 70, 76, 82 bp uzunluğunda, ligasyon olmasa bile görülen piklerdir. Bu piklerin varlığı ile çalışmada internal kontrol oluşturuldu. Kontrol piklerine göre elde edilen prob piklerini karşılaştırarak DNA miktarı belirlendi. Buna göre bu kontrol pikleri elde edilen prob piklerine göre büyükse kullanılan tümör DNA miktarının yeterli olmadığını, kontrol pikleri prob piklerinden küçük veya görünmüyor ise DNA miktarının yeterli olduğunu ifade etmektedir.

#### **4.2.2. Denatürasyon kalitesinin belirlenmesi**

Denatürasyon kalitesinin değerlendirilmesi çalışmada kullanılan kit içerisinde dizayn edilmiş 88, 92, 96 bp uzunluğunda DD kontrol fragmentleri bulunmaktadır. DD kontrol fragmentleri ligasyona bağımlı olup, tam olmayan denatürasyonda oluşan piklerdir. Bu piklerin varlığı denatürasyon sürecinde bir problem yaşandığının göstergesidir.

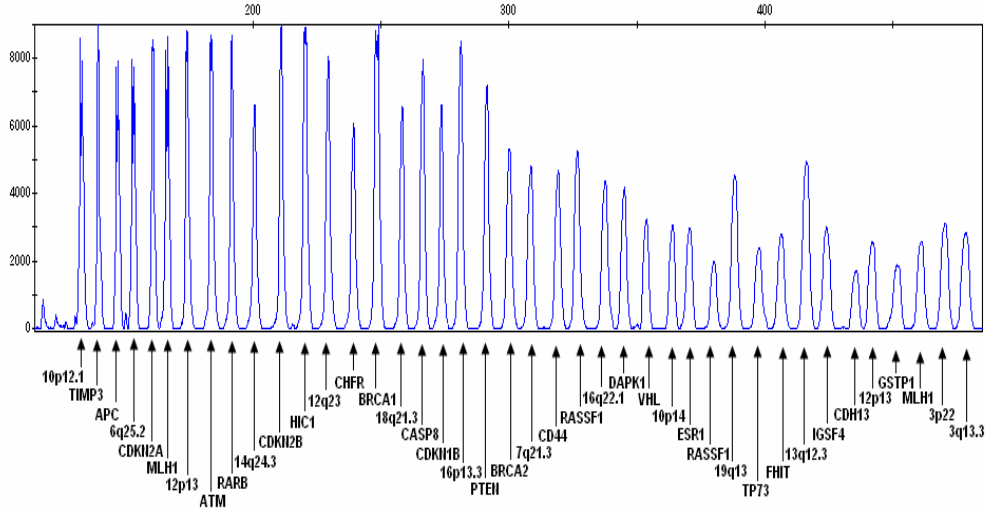
Çalıştığımız hastaların % 14'ünde DQ kontrol pikleri, prob piklerine göre oldukça büyüktü(Şekil 4.2.2.1). Bu hastalarda kaliteli pik elde edilememesinin nedeni de DNA'nın yeterli olmamasından ötürü olduğunun sonucuna varıldı. Diğer kaliteli pik elde edilemeyen örneklerde (%20), olası MLPA reaksiyonlarındaki hataların sorumlu olduğu düşünüldü. Bu örneklerin %12' sinde mevcut PCR ürünlerinin tekrar kapiller elektroforez cihazında yürütülmesiyle, %4'ünde ligasyon-digestion reaksiyon ürünlerinden tekrar çalışılan PCR reaksiyonu ile, %4'ünde de hibridizasyon reaksiyonlarının tekrarlanmasıyla değerlendirmeye uygun kalitede pikler elde edilebilmiştir.



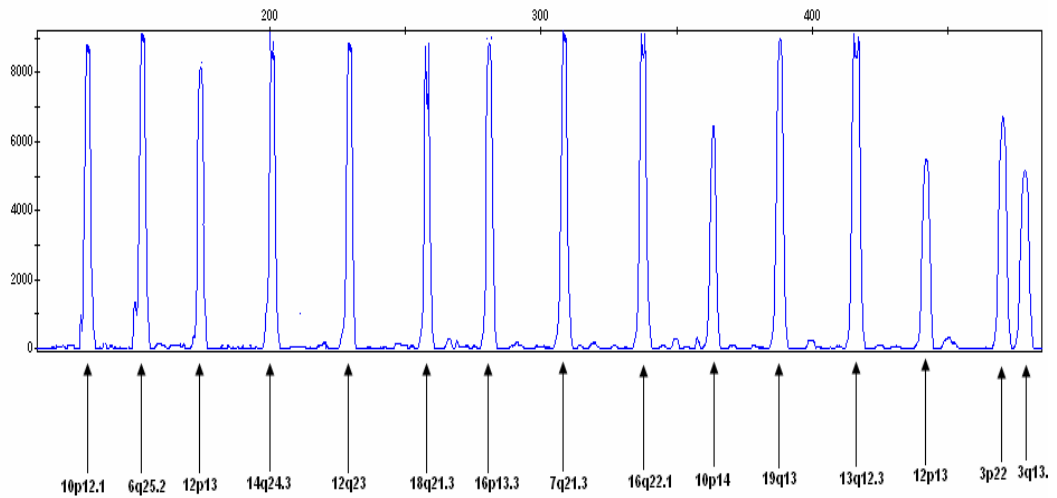
Şekil: 4.2.2.1: DQ ve DD kontrol pikleri yardımıyla değerlendirmeye alınamayan ve alınan pik görüntüleri.



İnternal kontrol olarak kullanılan sağlıklı bireylerin MS-MLPA pikleri ve piklerin ifade ettiği gen bölgeleri Şekil 4.2.2.2 ve Şekil 4.2.2.3'te gösterilmiştir.



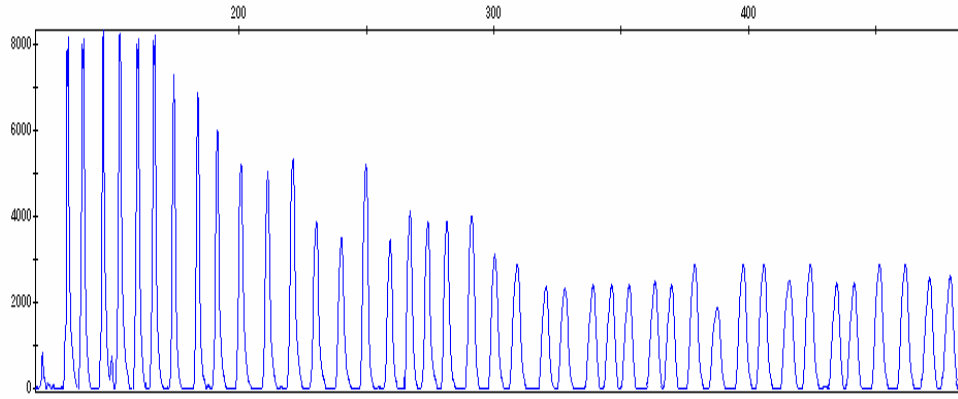
Şekil 4.2.2.2: İnternal kontrolde kullanılan olgunun enzim kesimi yapılmayan örneğinden çalışılan MLPA görünüsü ve prob bölgelerinin görünümü.



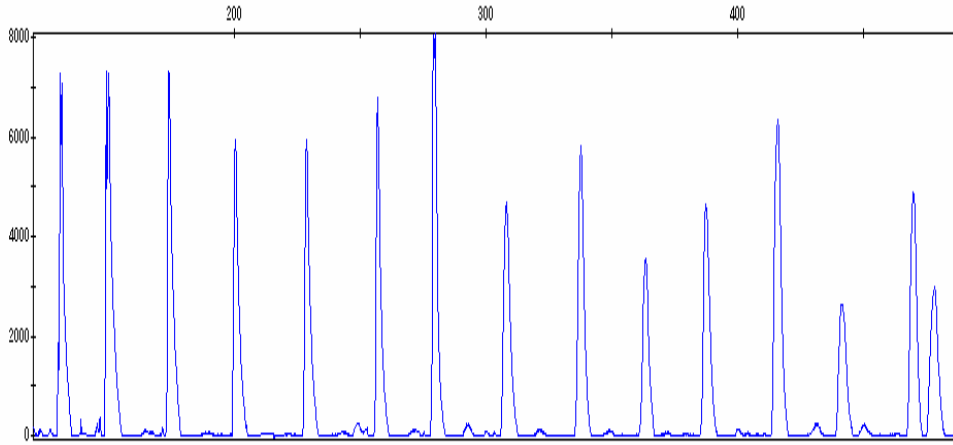
Şekil 4.2.2.3: İnternal kontrolde kullanılan olgunun enzim kesimi yapılan örneğinden çalışılan MLPA görünüsü ve prob bölgelerinin görünümü.

### **4.2.3 Metilasyona duyarlı HhaI endonükleaz kesim sonuçları**

Çalışmaya dahil edilen olguların, HhaI metilasyon spesifik enzimi ile muamele edilmiş örneklerinden elde edilen pik görüntüleri incelendi. Herhangi bir pik kaybı veya fazlası görülmeyen olguların bakılan prob bölgeleri açısından normal metilasyon profiline sahip olduğu yorumlandı. Çalışılan olgulardan yirmisinde (%20), tümöral ve sağlam akciğer doku örneklerinde incelenen tüm prob bölgelerinde normal metilasyon profili saptandı. Normal metilasyon profiline sahip hastalardan elde edilen pik görüntüleri Şekil 4.2.3.1 ve Şekil 4.2.3.2’de gösterilmiştir.

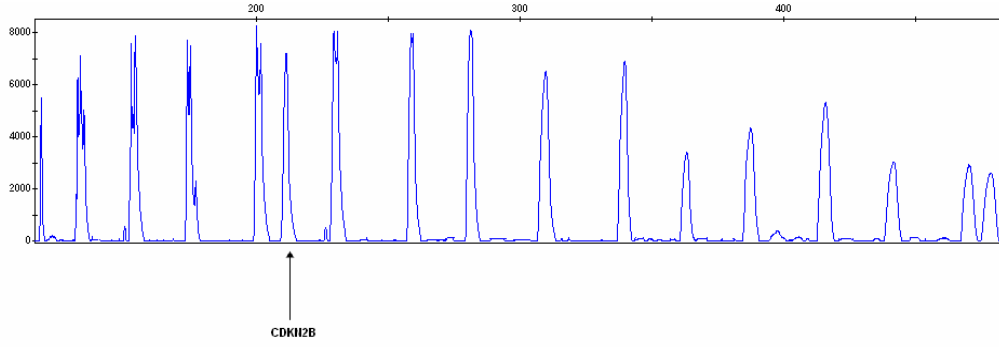


Şekil 4.2.3.1: Normal metilasyon profiline sahip bir hastanın tümör dokusuna ait enzim kesimi yapılmamış MLPA görüntüsü.

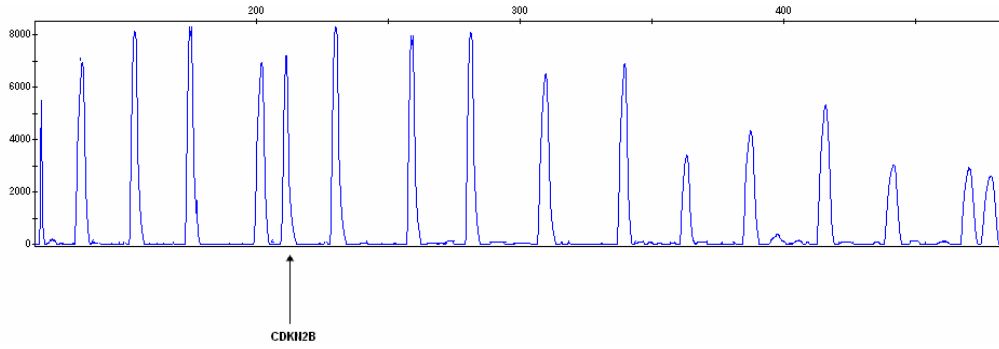


Şekil 4.2.3.2: Normal metilasyon profiline sahip bir hastanın tümör dokusuna ait enzim kesimi yapılmış MLPA görüntüsü.

Çalışmamızda metilasyon spesifik MLPA yöntemiyle tümör baskılayıcı gen bölgelerinin incelendiği olgulardan kırkdördünde (%44) hem tümöral hem de sağlam çevre akciğer dokularında benzer prob bölgelerinde metilasyon artışı olduğu saptandı. Bu artış, hastaların hem tümöral hem de çevre akciğer dokularında, HhaI enzimi ile kesim uygulanarak elde edilen pik görüntülerinde, kontrol piklerine ilave olarak ekstra pikler gözlenmesiyle saptandı. Görülen ekstra piklerin uzunluklarına göre karşılık gelen prob bölgesine göre hangi gende metilasyon artışı olduğu bulundu. Bu grupta incelenen hastalarda, hem tümör hem de çevre dokusunda aynı gen mutasyonunun gözlenmesi dikkat çekiciydi. Şekil 4.2.3.3 ve Şekil 4.2.3.4’de, her iki dokusunda da aynı gende metilasyon artışı saptanmış bir olguya ait pik görüntüleri gösterilmiştir.

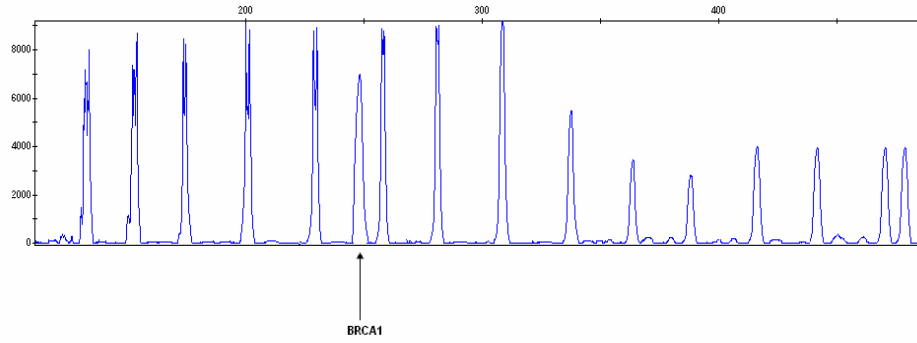


Şekil 4.2.3.3: Tümöral akciğer dokusunda *CDKN2B* geninde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü.

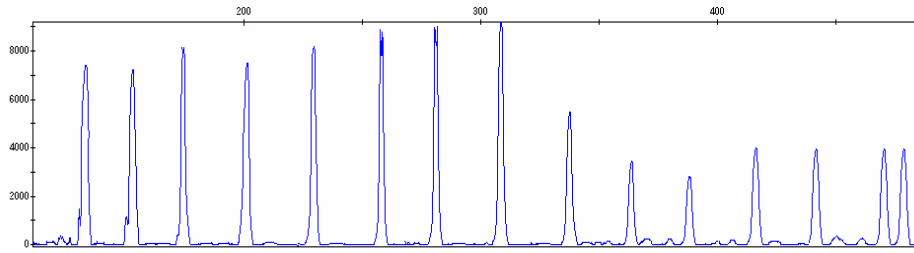


Şekil 4.2.3.4: Şekil 4.2.3.3'deki hastanın çevre akciğer dokusunun pik görüntüsü.

İncelenen olgular içerisinde yirmüç hastada (%23) ise tümöral dokularda farklı prob bölgelerinde metilasyon profili değişimleri saptanırken, çevre akciğer dokularında ilgili genler açısından herhangi bir metilasyon değişimi görülmedi. Bu gruba ait hastalardan birine ait pik görüntüleri Şekil 4.2.3.5 ve Şekil 4.2.3.6'da verilmiştir. Burada dikkat edilecek nokta aynı hastaya ait tümöral doku örneğinde metilasyon artışı görülürken, çevre akciğer dokusunda herhangi bir metilasyon artışının izlenmemesidir.

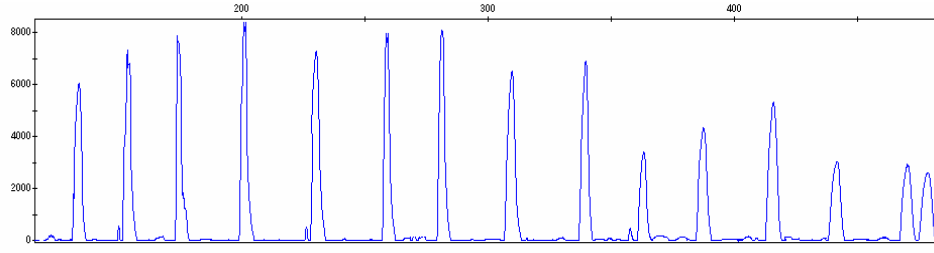


Şekil 4.2.3.5: Tümöral akciğer dokusunda *BRCA1* geninde metilasyon saptanan bir olgunun pik görüntüsü.

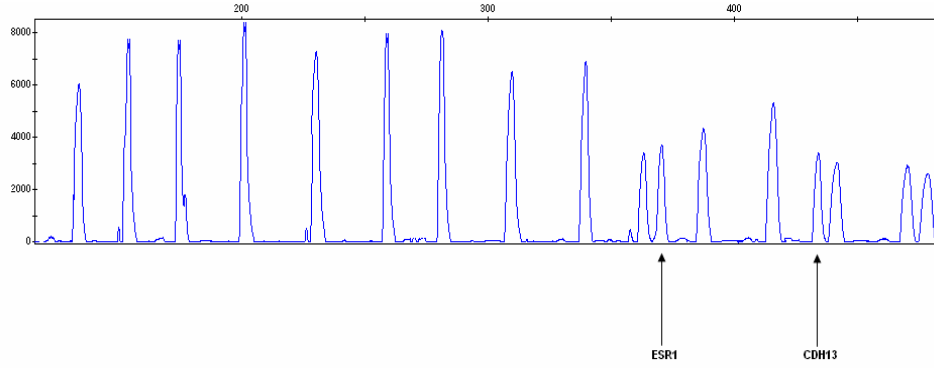


Şekil 4.2.3.6: Şekil 4.2.3.5'deki hastanın çevre akciğer dokusundan elde edilen ve herhangi bir gende metilasyon içermeyen pik görüntüsü.

Çalışma grubunda değerlendirilen hastaların onüçünde (%13), çevre akciğer dokularında farklı prob bölgelerinde metilasyon profillerinde değişimler görülürken, bu hastalara ait tümöral dokularda normal metilasyon profili saptandı. Şekil 4.2.3.7 ve Şekil 4.2.3.8'de pik görüntüleri verilen hastada, çevre akciğer dokularında *CDH13* ve *ESR1* genlerine ait prob bölgelerinin metile olduğu görülürken, aynı hastaya ait tümöral dokuda ilgili genler açısından herhangi bir metilasyon saptanmadı.

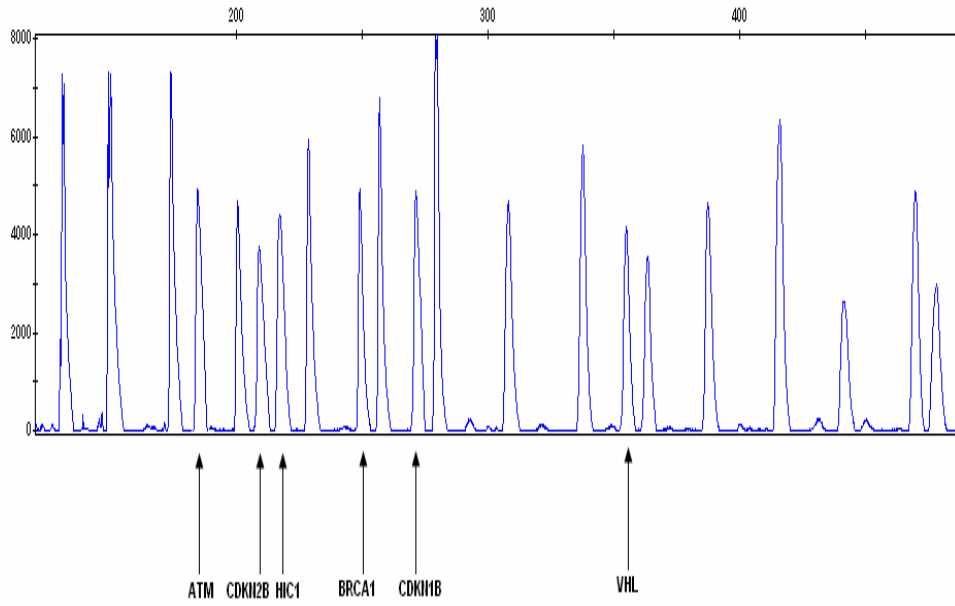


Şekil 4.2.3.7: Çevre akciğer dokusunda *CDH13* ve *ESR1* prob bölgelerinde metilasyon saptanan hastanın tümoral dokusundan elde edilen ve metilasyon içermeyen MLPA pik görüntüsü.



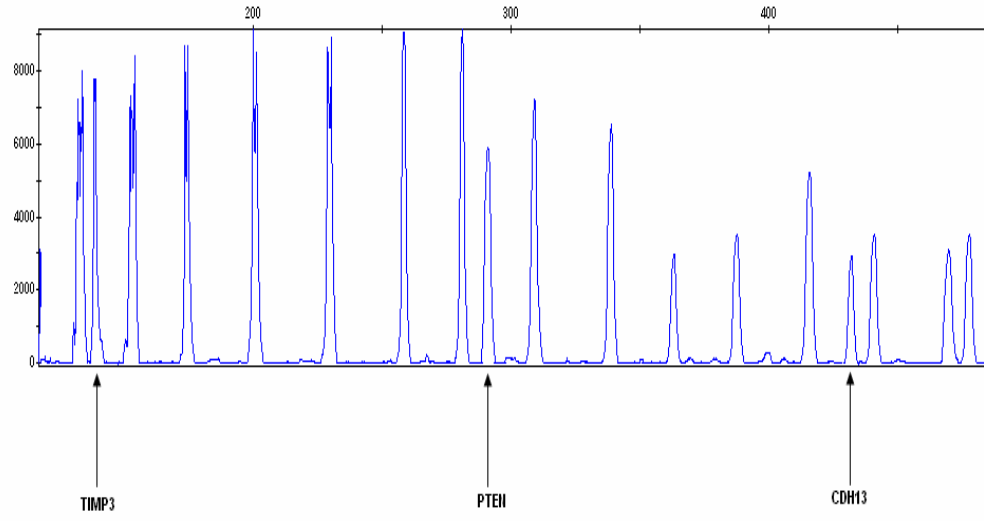
Şekil 4.2.3.8: Şekil 4.2.3.7'deki hastanın çevre dokusundan elde edilen ve *ESR1* ile *CDH13* genlerinde metilasyon saptanan MLPA pik görüntüsü.

Yapılan metilasyon spesifik MLPA çalışmasında incelenen tüm tümör ve çevre akciğer dokuları içerisinde en çok metillenen prob bölgesi %32 oranıyla *CDKN2B*, ikinci en sık metillenen %16,5 sıklık ile *BRCA1* prob bölgesiydi. Şekil 4.2.3.9'da verilen bir olgunun tümör dokusundan elde edilen pik görüntüsünde *CDKN2B*, *BRCA1*, *VHL*, *ATM*, *CDKN1B* ve *HIC1* prob bölgelerindeki metilasyon gösterilmiştir. Çalışmamızda tüm dokular içerisinde *HIC1* prob bölgesinde %9, *ATM* ve *VHL* prob bölgelerinde %5.5, *CDKN1B* prob bölgesinde ise %4.5 oranında metilasyon saptanmıştır.



Şekil 4.2.3.9: *CDKN2B*, *BRCA1*, *VHL*, *ATM*, *CDKN1B* ve *HIC1* prob bölgelerinde metilasyon saptanan bir hastanın tümör dokusuna ait MLPA pik görüntüsü.

Çalışılan olgular içerisinde metilasyon saptanan bir başka prob bölgesi de *CDH13*'dür. Tüm dokular içerisinde *CDH13* prob bölgesinde %11 oranında metilasyon saptandı. Yine çalışmada *PTEN* ve *TIMP3* prob bölgelerinde % 6.5 oranında metilasyon gözlemlendi. Şekil 4.2.3.10'da çevre akciğer dokularında bu genlerde metilasyon saptanan olguya ait pik görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.2.3.10: *TIMP3*, *PTEN* ve *CDH13* prob bölgelerinde metilasyon saptanan bir olgunun çevre akciğer dokusundan elde edilen MLPA pik görüntüsü.

Çalışmadaki genlerin metilasyon sıklıkları tümoral doku ve çevre akciğer dokulardaki sıklıkları Tablo 4.2.3.1’de belirtilmiştir.



Tablo 4.2.3.1: Çevre ve tümöral dokularda saptanan metilasyon sıklıkları.

Prob Bölgesi	Tümöral Dokuda Saptanan Metilasyon Oranı (%)	Çevre Dokuda Saptanan Metilasyon Oranı (%)
<i>TIMP3</i>	9	4
<i>APC</i>	4	--
<i>CDKN2A</i>	3	--
<i>MLH1</i>	4	--
<i>ATM</i>	7	4
<i>RARB</i>	6	--
<i>CDKN2B</i>	33	31
<i>HIC1</i>	7	11
<i>CHFR</i>	2	--
<i>BRCA1</i>	16	17
<i>CASP8</i>	--	2
<i>CDKN1B</i>	4	5
<i>PTEN</i>	4	9
<i>BRCA2</i>	--	--
<i>CD44</i>	6	3
<i>RASSF1</i>	4	4
<i>DAPK1</i>	--	--
<i>VHL</i>	4	7
<i>ESR1</i>	2	2
<i>TP73</i>	--	--
<i>FHIT</i>	--	--
<i>IGSF4</i>	4	2
<i>CDH13</i>	7	15
<i>GSTP1</i>	2	--

Bu sonuçlar incelendiğinde, akciğer kanserli tümöral ve çevre akciğer dokularında birbirlerine yakın oranlarda en sık *CDKN2B*, *BRCA1*, *CDH13* ve *HIC1* prob bölgelerinde metilasyon görülmüştür. Buna ek olarak yine tümöral ve çevre dokularda *PTEN*, *TIMP3*, *ATM*, *VHL*, *CD44*, *CDKN1B*, *RASSF1*, *IGSF4* ve *ESR1* prob bölgelerinde de metilasyon saptandı. Yapılan incelemelerde *DAPK1*, *TP73* ve *FHIT* prob bölgelerinde ise gerek tümöral dokularda gerekse çevre akciğer dokularında metilasyon saptanmadı. *APC*, *CDKN2A*, *MLH1*, *RARB*, *CHFR* ve *GSTP1* prob bölgelerinde farklı oranlarda tümöral dokularda metilasyon görülürken, çevre akciğer dokularında bu prob bölgelerinde metilasyon gözlenmedi. *CASP8* prob

bölgesinde ise tümöral dokularda metilasyon saptanmazken, çevre akciğer dokularında düşük oranda da olsa (%2) metilasyon piki tamamlandı.

Çevre akciğer dokularında, tümöral dokulara göre daha sık metilasyon saptanan prob bölgeleri *CDH13* (%15, %7), *VHL* (%7, %4), *PTEN* (%9, %4), *CDKN1B* (%5, %4), *CASP8* (%2, %0), *BRCA1* (%17, %16), *HIC1* (%11, %7) olup bu bölgeler içerisinde *CDH13* genine ait prob bölgesindeki metilasyon profilinin çevre akciğer dokuları ile tümöral doku arasındaki farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü(p=0,021).

Olgularda saptanan metilasyon oranlarının TNM sınıflamasına göre daha sağlıklı bir biçimde karşılaştırabilmek için T, N ve M'nin her biri ayrı ayrı metilasyon oranları ile değerlendirildi(Tablo 4.2.3.2-7). Bu değerlendirmeye göre T2 olgularda T1 ve T3 olgulara göre belirgin şekilde daha sık metilasyon saptandı.

Tablo 4.2.3.2: T1, T2 ve T3'lü olguların tümör dokularında saptanan metilasyon sıklıkları

	Tümör Dokularında Metilasyon Saptanan Toplam Prob Bölgesi Sayısı	Toplam Olgu Sayısı
T1	46	41
T2	74	47
T3	8	12

Tablo 4.2.3.3: T1, T2 ve T3'lü olguların çevre dokularında saptanan metilasyon sıklıkları

	Çevre Dokularında Metilasyon Saptanan Toplam Prob Bölgesi Sayısı	Toplam Olgu Sayısı
T1	39	41
T2	64	47
T3	10	12

Bu duruma benzer olarak N1 olgularda N0 ve N2 olgulara göre artmış metilasyon oranları saptandı.

Tablo 4.2.3.4: N0, N1 ve N2’li olguların tümör dokularında saptanan metilasyon sıklıkları

	Tümör Dokularında Metilasyon Saptanan Toplam Prob Bölgesi Sayısı	Toplam Olgu Sayısı
N0	31	26
N1	90	64
N2	7	10

Tablo 4.2.3.5: N0, N1 ve N2’li olguların çevre dokularında saptanan metilasyon sıklıkları

	Çevre Dokularında Metilasyon Saptanan Toplam Prob Bölgesi Sayısı	Toplam Olgu Sayısı
N0	25	26
N1	82	64
N2	9	10

Metastaz yönünden değerlendirilen olguların yalnızca 4 tanesi (%4)M1 olarak değerlendirildi. Her ne kadar istatistiksel olarak değerlendirilemese de bu 4 olgunun hepsinde de en az bir prob bölgesinde metilasyon saptandı.

Tablo 4.2.3.6: M0 ve M1’li olguların tümör dokularında saptanan metilasyon sıklıkları

	Tümör Dokularında Metilasyon Saptanan Toplam Prob Bölgesi Sayısı	Toplam Olgu Sayısı
M0	62	96
M1	4	4

Tablo 4.2.3.7: M0 ve M1’li olguların çevre dokularında saptanan metilasyon sıklıkları

	Çevre Dokularında Metilasyon Saptanan Toplam Prob Bölgesi Sayısı	Toplam Olgu Sayısı
M0	37	96
M1	2	4

Çalışmaya dahil edilen olguların gradeleri erken evre (Grade 1-2) ve geç evre (Grade 3) olarak gruplandırıldı. Araştırılan prob bölgelerindeki metilasyon sıklıkları ile olguların evreleri incelendiğinde; geç evrede saptanan olguların hem tümör hem de çevre akciğer dokularında erken evredeki olgulara göre belirgin şekilde yüksek oranda metilasyon saptandı(Tablo 4.2.3.8).

Tablo 4.2.3.8: Grade'lere göre saptanan metilasyon sıklıkları

	Grade	Tümör Dokusunda Saptanan Metilasyon Sıklığı	Çevre Dokuda Saptanan Metilasyon Sıklığı
<i>TIMP3</i>	1-2	0	0
	3	9	4
<i>APC</i>	1-2	0	0
	3	4	0
<i>CDKN2A</i>	1-2	0	0
	3	3	0
<i>MLH1</i>	1-2	0	0
	3	4	0
<i>ATM</i>	1-2	0	0
	3	7	4
<i>RARB</i>	1-2	0	0
	3	6	0
<i>CDKN2B</i>	1-2	4	2
	3	29	29
<i>HIC1</i>	1-2	0	2
	3	7	9
<i>CHFR</i>	1-2	0	0
	3	2	0
<i>BRCA1</i>	1-2	2	2
	3	14	15
<i>CASP8</i>	1-2	0	0
	3	0	2
<i>CDKN1B</i>	1-2	0	0
	3	4	5
<i>PTENT</i>	1-2	0	1
	3	4	8
<i>BRCA2</i>	1-2	0	0
	3	0	0
<i>CD44</i>	1-2	2	0
	3	4	3
<i>RASSF1</i>	1-2	0	0
	3	4	4
<i>DAPK1</i>	1-2	0	0
	3	0	0
<i>VHL</i>	1-2	0	0
	3	4	7
<i>ESR1</i>	1-2	0	0
	3	2	2
<i>TP73</i>	1-2	0	0
	3	0	0
<i>FHIT</i>	1-2	0	0
	3	0	0
<i>IGSF4</i>	1-2	0	0
	3	4	2
<i>CDH13</i>	1-2	1	1
	3	6	14
<i>GSTP1</i>	1-2	0	0
	3	2	0

## **5.TARTIŞMA**

Kanser günümüzün en önemli sağlık problemlerinden birisidir. Sıklılığının ve mortalitesinin yüksek olması kanser üzerindeki çalışmaların yoğunlaşmasını sağlamıştır. Özellikle kanser etyolojisinin aydınlatılması, tedavi ve erken tanı bu çalışmaların başını oluşturmaktadır. Kanser genetik bir hastalık olarak da kabulünden sonra bu çalışmalar özellikle genetik alt yapının araştırılması üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan alışmalar akciğer kanserinin sigara içimi ile ilişkisini belirgin bir şekilde ortaya koymuştur. Fakat ağır sigara iicilerinin sadece %20' sinde akciğer kanserinin görülmesi ve ailelerinde akciğer kanseri olan bireylerde, toplumun diğer kesimlerine göre daha yüksek oranda akciğer kanserine yakalanmaları akciğer kanserinin genetik alt yapısının olduğunu göstermiştir(69,70).

Akciğer kanserinin genetik etyolojisinin aydınlatılmasına yönelik bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır(3,7,12,16,18,32,37,45,49,50). Bu çalışmalarda farklı teknikler ve doku şekilleri kullanılmış, akciğer kanseriyle ilişkilendirilmiş birçok gen tanımlanmış ve halen de tanımlanmaktadır.

Çalışmamıza İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesinde, histopatolojik olarak incelenerek "kk hücreli olmayan akciğer kanseri" tanısı almış 100 olgu dahil edilmiştir. Olgulara ait %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş, parafin bloklara gömülü dokulardan hazırlanmış (FFPT) ve hematoksilen-eozin ile boyanmış arşiv preparatları, yeniden WHO kriterlerine göre gradelendirilmiş ve TNM sınıflamasına göre evrelendirilmiştir. Her hastaya ait doku örneklerinden kanser dokusu içeren 5 mikronluk kesitlerden elde edilen DNA rnekleri çalışma grubu olarak, aynı hastaya ait kanser dokusu içermeyen kesitlerden elde edilen DNA rnekleri de kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. Olguların yaşları, cinsiyetleri, biyopsi şekli, takip aralıkları, hastalara ait patoloji raporları, hasta dosyalarından temin edilmiştir.

Elde edilen DNA örnekleri metilasyon spesifik MLPA yöntemiyle, tanımlanmış tümör baskılayıcı genlere yönelik hazırlanmış ME001 probmiksiyle çalışılmış, incelenen prob bölgelerindeki metilasyon profilleri araştırılmıştır.

### **5.1. Elde Edilen Verilerin Literatür Bilgileri ile Karşılaştırılması:**

Bugüne kadar tümör baskılayıcı genlerdeki epigenetik değişimlerin incelendiği birçok çalışma yapılmıştır(3,7,12,16,18,32,37,45,49,50,51,64,65). Bu epigenetik değişimler içerisinde en önemli çalışma sahası metilasyon olmuştur. Araştırmacıların geçmişte yoğunlaştıkları alanlar gen düzeyindeki mutasyonlar ve sonuçları iken, metilasyonun kanser genetiğindeki rolünün anlaşılması nedeniyle son yıllarda farklı kanser genlerinin metilasyon profilleri ve sonuçları üzerine yoğunlaşmıştır. Araştırmacılar genomdaki metilasyon profillerindeki değişimleri incelerken birçok farklı teknik kullanmışlardır. Bu tekniklere her geçen gün yeni tekniklerin ilave edilmesiyle bu araştırma sahası geniş boyutlara ulaşmış ve birçok gendeki metilasyon değişimleri net bir şekilde tanımlanmıştır.

Akciğer kanseriyle ilişkilendirilmiş tümör baskılayıcı genlerdeki metilasyon değişimlerinin çalışıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda farklı doku kaynakları, farklı teknikler ve farklı genler incelenmiştir(37,38,49,50,51).

MLPA tekniği gerek dünya gerekse ülkemiz için oldukça yeni bir tekniktir. Üretici firma tarafından sürekli yeni araştırma kitleri piyasaya sürülmektedir. Bu kitlerden biri olan metilasyon çalışmalarında kullanılan ME001B MLPA probmiksiyle literatürde yayınlanmış bir çalışma bulunamadı. Bilgilerimiz doğrultusunda bu çalışma akciğer kanserlerinde metilasyon profillerinin MS-MLPA tekniği ile araştırıldığı ilk çalışma özelliğine sahiptir. Bu nedenle elde edilen veriler diğer metilasyon analiz yöntem bulguları ile karşılaştırılacaktır.

### **5.1.1. TIMP3 Prob bölgesindeki metilasyon**

*TIMP3* geni 22q12.13 bölgesinde lokalize bir tümör baskılayıcı gendir. Bu gen varlığında Vasküler Endotel Büyüme Faktörünün (VEGF), Vasküler Endotel Büyüme Faktör Reseptörüne bağlanması engellenir. Ayrıca bu gen proapoptotik aktiviteye sahip olup, normalden fazla eksprese olduğunda tümör büyümesini engellediği görülmüştür.

Bowman ve arkadaşlarının(3) yayınlanan çalışmalarında KHOAK'li vakaların tümör dokularında %26 oranında *TIMP3* geninde metilasyon saptamışlardır. Bu çalışmada metilasyon profilini inceleyebilmek için metilasyon spesifik PCR (MSP) kullanılmıştır. Dammann ve arkadaşlarının(7) yapmış oldukları başka bir çalışmada ise akciğer kanserli hücre serilerinde bu gendeki metilasyon değişimlerini araştırmışlar ve % 29 oranında metilasyon saptamışlardır. Bu çalışmalar sonucunda *TIMP3* genindeki metilasyon artışının akciğer kanseri oluşumunda etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bu genin akciğer kanseriyle ilişkisinin tanımlandığı araştırma sayısı çok fazla değildir. Yapmış olduğumuz çalışmada tümöral dokularda %9, çevre dokularda da %4 oranında *TIMP3* geni prob bölgesinin metile olduğu saptanmıştır. Elde ettiğimiz bu oranın literatürde verilen oranlardan düşük olduğu görülmektedir. Bu oran farkı diğer genlerdeki değişimler incelendikten sonra topluca tartışılacaktır. Çalışmamızda literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olarak sağlam çevre akciğer dokularındaki metilasyon değişimleri de incelenmiştir. Çevre akciğer dokularında da metilasyon saptanan olguların yine tümöral dokularında metile olduğu görülmüştür. Çevre akciğer dokularında metilasyon saptanması, bu dokularda başlayan epigenetik değişimlerin göstergesi olabilir. Ayrıca rezeksiyon sırasında tümör hücrelerinin bulunduğu tam anlamıyla kanser hücresi içermeyen doku sınırlaması doğru yapılmamış olabilmektedir. Ayrıca rezeksiyon alanının dar tutulması ile bağlantılı olabileceği de düşünülmektedir.



### **5.1.2. APC Prob bölgesindeki metilasyon**

*APC* (Adenomatöz Poliposis Colli) geni 5q21 bölgesinde lokalize 15 ekzonlu büyük bir tümör baskılayıcı gendir. *APC* geninin özellikle kolorektal kanserlerle ilişkisi açıkça tanımlanmıştır. *APC* geni tümör baskılayıcı etkisini hücre adezyonunu ve hücrel migrasyonu aktive ederek gösterir. Bu gen ayrıca mitoz sırasında mikrotübül dinamiklerini regüle eder.

*APC* geninin akciğer kanserlerinde rol oynadığına dair pek çok çalışma yayınlanmıştır(2,16,23,32,40,51,54). Bunlardan bir kısmı da promoter bölgesinin metilasyonu ile *APC* geninin inaktivasyonu ile ilgili yayınlardır.

Öte yandan Grote ve arkadaşlarının(23) yaptığı çalışmada bronşial aspirasyon materyalinden *APC* geninin kantitatif metilasyon analizleri %98.5 spesivite ve %39' luk sensitivite ile primer akciğer kanserlerinde biomarker olarak kullanılabileceğini gösterilmiştir.

Arvind ve arkadaşlarının(2) yapmış oldukları bir çalışmada *APC* geninin metilasyon profilini MethyLight isimli bir çeşit RealTime PCR (RT PCR) tekniği ile araştırmışlar ve %74 oranında metilasyon saptamışlardır. Bu oran literatürde yayınlanmış en yüksek *APC* metilasyon oranıdır. Buna benzer olarak Grote ve arkadaşlarının(23) RealTime PCR ile yaptıkları çalışmada *APC* promoter metilasyon oranı %71 olarak bildirilmiştir. Bu iki çalışmada saptanan yüksek metilasyon oranı kullanılan yöntemin sensitivitesine bağlı olarak yüksek bulunmuştur. Zira MSP yöntemiyle Maruyama(40) %38, Kim(32) %48, Shinichi(54) %45, Fraipond(16) %7 oranlarında KHOAK'li tümör dokularında *APC* geninin promoter bölgesinde metilasyon saptamışlardır. Bu araştırmalardan çıkan sonuç *APC* geninin promoter bölgesindeki metilasyonunun incelenmesinde kullanılacak yöntemin duyarlılığının çok önemli olduğudur. Bizim de yapmış olduğumuz çalışmada tümöral dokularda %4 oranında metilasyon saptanırken çevre akciğer dokularında hiç metilasyon görülmemiştir. Saptadığımız oranlar literatürdeki oranlara göre düşüktür.

### **5.1.3. CDKN2A Prob bölgesindeki metilasyon**

*CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A-p16) geni, 9p21.3 bölgesinde lokalize 3 ekzonlu bir tümör baskılayıcı gendir. Gen, siklin-bağımlı kinaz inhibitör ailesine mensuptur. Hücre ölümsüzlüğü ve tümör gelişiminden sorumlu olan CDK4 ve CDK6' nın inhibitörüdür.

*CDKN2A* geninin metilasyon profilleri, birçok kanser türünde değerlendirilmiştir. Bu gendeki metilasyon değişimleri özellikle de akciğer kanserlerinde incelendiği birçok çalışma yayınlanmıştır(3, 12, 18, 32, 51,66). Bowman ve arkadaşlarının(3) KHOAK'li tümöral dokularda yaptıkları çalışmada *CDKN2A* geninin promoter bölgesinde %25 oranında metilasyon saptanmıştır. Buna benzer olarak Fronaka ve arkadaşlarının(18) yaptıkları çalışmada ise bu oranı %38 olarak bildirilmiştir. Eunice ve arkadaşları(12) %64, Sato(50) %21.7, Kim ve arkadaşları(32) ise bu oranı %22 olarak bulmuşlardır. Ulivi ve arkadaşlarının(66) fluorescent-MSP yöntemiyle yaptığı çalışmada *CDKN2A* geninde %79 oranında metilasyon saptaması, bu gen için de metilasyon taramasında kullanılan yöntemin duyarlılığının arttıkça metilasyon oranının arttığının göstergesidir.

Yapmış olduğumuz çalışmada *CDKN2A* geninin tümöral dokularda %2 oranında metile olduğu, buna karşılık çevre akciğer dokusunda herhangi bir metilasyonun saptanmadığı görülmüştür. Çalışmamızdaki bu oranın literatür bilgilerine göre düşük olduğu görülse de Kim ve arkadaşlarının(32) yaptıkları bir çalışmada *BRCA1* geninin metilasyonunun *CDKN2A* geninin homozigot delesyonu ile yakından ilişkili olduğunu göstermesiyle, bizim çalışmamızdaki *CDKN2A* metilasyonunun düşük oranda saptanmasına bir açıklık getirmiştir. Zira *BRCA1* geninin metilasyonunu akciğer kanserlerinde araştıran fazla çalışma bulunmamakla birlikte, bizim çalışmamızda *BRCA1* geni metilasyonu ikinci sıklıkta saptanmıştır.

#### **5.1.4. MLH1 Prob bölgesindeki metilasyon**

*MLH1* (mutL homolog 1) geni 19 ekzondan oluşan, 3p21.3 bölgesinde lokalize DNA mismatch repair mutL/hexB ailesine mensup bir DNA tamir genidir. Bu gen mutasyonları özellikle kolon kanserleriyle ilişkilidir.

Safar ve arkadaşlarının(49) KHOAK'de yapmış oldukları bir çalışmada %15 oranında *MLH1* geni promoter bölge metilasyonu saptamışlardır. Kim ve arkadaşları(32) bu oranı %18 olarak bulmuşlardır. Arvind ve arkadaşlarının(2) MethyLight yöntemiyle bu oranı %4 olarak bulmaları, bizim de çalışmamızda bulduğumuz tümöral dokularda %4, çevre akciğer dokularında hiç saptanmamasını desteklemektedir. Metilasyon spesifik PCR yönteminin duyarlılığının MethyLight yöntemine göre daha düşük olması metilasyon sıklıklarının geniş aralıklar arasında olmasını açıklamaktadır. Zira daha önce adı geçen çalışmalar, MethyLight yönteminden daha düşük duyarlılıkta olan MSP yöntemiyle çalışılmıştır.

#### **5.1.5. ATM, IGSF4, CD44 ve CHFR Prob bölgelerinin metilasyonu**

*ATM* (ataxia telangiectasia mutated) geni 11q22.3 bölgesine lokalize 64 ekzondan oluşan büyük bir gendir. Bu genin en önemli fonksiyonu fosforilasyon mekanizması ile *TP53* genini aktive etmesidir. Bir diğer önemli görevi de ionize radyasyon ile oluşan DNA hasarına karşı DNA tamir genlerinden olan *BRCA1*'i fosforile ederek cevap vermesidir.

*ATM* genindeki metilasyon değişimlerinin incelendiği farklı kanser türlerinde birçok çalışma yapılmasına karşın akciğer kanserlerinde bu değişimlerin araştırıldığı çalışma sayısı azdır. Safar ve arkadaşlarının(49) KHOAK'li vakalarda bu gen bölgesindeki metilasyon profilini inceledikleri çalışmalarında tümöral dokularında metilasyon oranını %19 olarak bildirmişlerdir. Aynı grubun farklı hastalarda ancak aynı teknikle (MSP) yapmış oldukları bir başka çalışmada ise bu oranı %47 olarak

bulmuşlardır(50). Bizim çalışmamızda ise bu oran tümöral dokularda %7, çevre akciğer dokularında ise %4 olarak bulunmuştur.

*IGSF4* (CADM1-cell adhesion molecule 1) geni 11q23.2 bölgesinde lokalize 10 ekzondan oluşan, akciğer kanserlerinde tümör formasyonunu ve metastazını baskılayan bir gendir. Murakami' nin(41) yapmış olduğu bir çalışmada tümörlü akciğer dokusunda bu genin metilasyon oranı %44 olarak bulunmuştur. Kuramochi ve arkadaşlarının(37) yaptıkları bir çalışmada *IGSF4* geninde heterozigosite kaybı %85 olarak bildirilmiş olup heterozigosite kaybında promoter metilasyonunun önemli oranda etkili olduğu ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda da *IGSF4* geninde tümöral dokularda %4, çevre akciğer dokularında ise %2 oranında metilasyon saptanmıştır. Her iki çalışmaya göre saptanan oran düşüktür.

*CHFR* (checkpoint with forkhead and ring finger domains) geni 12q24.33 bölgesinde lokalize 20 ekzondan oluşur. Protein-protein interaksiyonunda görevlidir. Corn ve arkadaşlarının(6) yayınlanan çalışmalarında akciğer kanserlerinde %10 oranında metilasyon saptamışlardır. Mariatos ve arkadaşlarının(39) yapmış oldukları çalışmada ise %6 heterozigozite kaybı saptanırken çalışmamızda incelenen tümöral dokularda %2 sıklıkta metilasyon gözlenmiştir. Çevre dokularda ise *CHFR* metilasyonu saptanmamıştır.

*CD44* geni 11 ekzonlu, 11p13 bölgesinde lokalize, hücrel diferansiasyonda rol oynayan bir gendir. Franzmann ve arkadaşları(17) baş-boyun kanserlerinde bu genin metilasyonunu araştırmışlar ve ekspresyonun azaldığı 11 olgudan 9'unda bu gende hipermetilasyon saptamışlardır. Bu genin metilasyon profilinin incelenmesinin erken tanıda potansiyel bir marker olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Literatürde akciğer kanserlerinde bu genin metilasyonunun araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak bizim çalışmamızda *CD44* geninin tümöral dokularda %6, çevre akciğer dokularında ise %3 oranında metile olduğu düşünüldüğünde, akciğer kanserlerinde *CD44* geninin araştırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

### **5.1.6. RARB ve GSTP1 Prob bölgelerinin metilasyonu**

*RARB* (retinoik asit reseptör Beta) geni 8 ekzonlu, 3p24.3 bölgesinde lokalize, steroid/tiroid hormon reseptör süper ailesine üye bir genidir. *RARB*, gen ekspresyonu üzerindeki direkt düzenleyici etkisiyle hücre fonksiyonlarını düzenler. Bu fonksiyonlarıyla kanser oluşumunda etkili bir genidir. *RARB* geninin metilasyon değişimlerinin incelendiği birçok kanser türünde farklı çalışmalar yapılmıştır(3,23,40,53,62). Bowman ve arkadaşlarının(3) yapmış oldukları bir çalışmada KHOAK'li tümöral dokularda *RARB* geninde %40 oranında metilasyon saptamışlardır. Yine Grote ve arkadaşlarının(23) çalışmasında bu oran %56, Tomizawa ve arkadaşları(64) %26, Toyooka ve arkadaşları(54) %27, Maruyama ve arkadaşları(40) ise %27 olarak saptamışlardır. Yapmış olduğumuz çalışmada ise *RARB* genindeki metilasyon oranını tümöral dokularda %6 olarak bulurken, çevre akciğer dokularında ise bu gende metilasyon saptanmamıştır.

*GSTP1* (glutathione S-transferase pi) geni, 11q13.3 bölgesinde lokalize, 7 ekzonlu bir genidir. Bu gen özellikle glutatyon mekanizmasının düzenlenmesinde görev almaktadır. Toyooka ve arkadaşlarının(54) yaptıkları çalışmada, KHOAK'li hastanın tümör dokusunda %10 oranında *GSTP1* geninde metilasyon saptamışlardır. Buna benzer olarak, Kim ve arkadaşları(32) bu oranı %15 olarak bulurken, Arvind ve arkadaşları(2) MethyLight yöntemi ile bu oranı %40'a taşıdıklarını iddia etmişlerdir. Ancak, Maruyama ve grubunun(40) 124 serilik çalışmalarında bu gende metilasyon saptanmamıştır. Bizim serimizde *GTSP1* gen metilasyonu iki örnekte gözlenmiştir Çevre dokulara özgü metilasyon piki saptanmamıştır.

### **5.1.7. CDKN2B Prob bölgesi metilasyonu**

*CDKN2B* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2B,p15) geni, 9p21.3 bölgesinde lokalize, 2 ekzonlu, *CDKN2B* siklin bağımlı kinaz inhibitör ailesine üye bir genidir. Bu gen, RB1' i fosforilleyerek CDK4/CDK6' yı inhibe eder. Bu sayede G1 fazının regülasyonu sağlanır.

Fronaka ve arkadaşlarının(18) yayınlanan çalışmalarında KHOAK'li tümöral dokularda bu genin metilasyon sıklığı %20 bildirilmiştir. Arvind ve arkadaşları(2) ise bu oranı %13 olarak saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ise bu oran tümöral dokularda %33, çevre akciğer dokularında ise %31 olarak bulunmuştur. *CDKN2B* metilasyonu araştırma serimizde en fazla metilasyona uğramış genidir.

### **5.1.8. RASSF1 ve ESRI Prob bölgelerinin metilasyonu**

*RASSF1* (Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1) geni, 6 ekzondan oluşan, 3p21.3 kromozom bölgesinde yer alan, tümör baskılayıcı bir genidir. Özellikle KHAK'leriyle ilişkisi yakından tanımlanmış, hücre siklusunun sürekli görevli bir genidir.

Safar ve arkadaşlarının(49) yaptıkları çalışmada, *RASSF1* geni metilasyon sıklığı %15, Dammann ve arkadaşları(7) ise bu oranı %71 gibi yüksek bir oranda saptamışlardır. Tomizawa(64) %29 ve Maruyama(40) ise %41 olarak bu oranı saptamışlardır. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada *RASSF1* prob bölgesindeki metilasyon oranı tümörlü dokularda %4, çevre akciğer dokularında da %4 oranında bulunmuştur. Görüldüğü üzere diğer genlerde saptanan metilasyon oranlarındaki farklar bu gen içinde görülmüştür. Bu çalışmalarda Safar ve arkadaşları RealTime PCR, Dammann, Tomizawa ve Maruyama ise MSP yöntemiyle çalışmışlardır. Literatürde en yüksek oran RealTime PCR yöntemiyle yapılan çalışmada saptanmıştır. Bu farkların kullanılan yöntemlerin hassasiyeti ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

*ESR1* (estrogen receptor 1) geni, 6q25.1 bölgesinde lokalize, 8 ekzondan oluşan, steroid/tiroid hormon nükleer reseptör süper ailesine mensup bir gen dir. Bu gen hormona bağılı gen ekspresyonunun inhibisyonunda, ligandla aktive olan transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. Böylelikle gen, gen ekspresyonu üzerinde büyük bir rol oynamaktadır.

*ESR1* geninin akciğer kanserlerindeki metilasyon profillerinin incelendiğı fazla çalışma yayınlanmamıştır(65,74). *ESR1* geni metilasyonunun prostat kanseri ile ilişkisini gösteren bir çok çalışma yapılmış ve ilişkisi gösterilmiştir(74). Yapılan az sayıdaki çalışmalardan biri olan Tsou JA ve arkadaşlarının(65) yaptıkları çalışmada *ESR1* geninin metilasyonunun özellikle akciğer adenokarsinomlarında, diğ er hücre tiplerine göre daha sık oranda gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada bu ilişkiyi *RASSF1* geninde en yüksek oranda saptamışlardır. Yaptığımız çalışmada incelenen 100 tümöral dokunun 2'sinde, aynı şekilde 100 çevre akciğ er dokusunun 2' sinde *ESR1* geninde metilasyon saptanmıştır. Bu genin akciğ er kanserlerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için yapılan çalışma sayısının artırılması gerekmektedir. Özellikle prostat kanseri ile ilişkisinin anlaşılmasından sonra birçok kanser türlerinde de bu ilişki incelenmeye başlanmıştır. Bilinen gerçek bu genin gen ekspresyonu üzerindeki etkisidir. Bu özelliğ in metilasyon gibi bir epigenetik mekanizma ile inaktive edilmesi gen ekspresyonu etkileyeceğ inden kanser oluşunda etkili olabilir.

### **5.1.9. BRCA1 ve HIC1 Prob bölgelerinin metilasyonu**

*BRCA1* (breast cancer 1, early onset) geni, 17q21 bölgesinde lokalize, 23 ekzondan oluşan büyük bir gen dir. Ubiquitin ligaz aktivitesinde rol oynayarak tümör baskılayıcı etkisini gösterir. Ayrıca *BRCA1* kromatin yapısının korunmasında etkili genler içerisinde yer almaktadır. Bu etki gösterdiğı DNA tamir özelliğ i ile sağ lanmaktadır. Bu gende görülen mutasyonlar veya özellikle de metilasyon ile oluşan epigenetik değ işimler, genin inaktivasyonuna sebep olacak ve bu fonksiyonların kaybıyla kanser oluşumunda etkili olacaktır. Meme kanseri baş ta olmak üzere birçok kanser türünde bu ilişki aç ığ a çıkarılmış tır. Akciğ er kanserlerinde yapılan çalışma sayısı

oldukça azdır. Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada metilasyon frekansı %6 olarak belirtilmiştir(35). Bizim elde ettiğimiz sonuçlarda bu genin metilasyon oranı diğer genlere oranla daha yüksek saptanmıştır. Bu oran tümörlü dokularda %16, çevre akciğer dokularında ise %17' dir. Elde edilen sonuçlar *BRCA1* geninin akciğer kanserinde de etkili olduğunu göstermektedir.

*HIC1* (hypermethylated in cancer 1) geni 17p13.3 bölgesinde lokalize, 2 ekzondan oluşan, transkripsiyon faktörü kodlayan küçük bir gendir. *HIC1* geni ile ilgili olarak yapılan en ilginç çalışma Arvind ve arkadaşlarının(2) MethyLight tekniği ile yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada *HIC1* geninin metilasyon oranı %98 gibi çok yüksek bir değerde bulunmuştur. Bizim çalışmamızda bu oran tümöral dokularda %7, çevre dokularında ise %11 olarak bulunmuştur. Bu gene ilişkin metilasyon frekansı diğer genlerle karşılaştırıldığı zaman yüksektir.

#### **5.1.10. CASP8, CDKN1B, PTEN, VHL ve CDH13 Prob bölgelerinin metilasyonu**

*CASP8* (caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase) geni, 2q33-q34 kromozomal bölgelerinde lokalize, sistin-aspartik asid proteaz (caspase) ailesinden bir gendir. Gen apoptoziste görev alır. Shivapurkar ve arkadaşları(60), yapmış oldukları çalışmada KHOAK' li vakalarda *CASP8* geninin metilasyon profilini incelemişler ve bu gende metilasyon saptamamışlardır. Aynı çalışmada KHAK' li vakalarda çalışılmış ve metilasyon oranı %58, bronşial karsinoidlerde %30 olarak saptanmıştır. Bu yayında *CASP8*' in nöroendokrin akciğer tümörlerinde tümör baskılayıcı gen rolü oynadığı iddia edilmiştir. Çalışmamızda bu gendeki metilasyon oranı çevre akciğer dokularında %2 olarak bulunurken, tümöral dokularda bu gende metilasyon saptanmamıştır.

*CDKN1B* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)) geni, 12p13.1-p12 kromozomal bölgesinde lokalize, 3 ekzonlu bir gendir. Gen CDK (siklin bağımlı kinaz) inhibitörü ailesindedir. *CDKN1B* geni hücre farklılaşmasını kontrol eden sinyal ileti



sisteminde görev alır. Gende oluşan değişimler bu ileti sisteminde aksamalara neden olacağından kanser oluşumunda etkili olur. Yaptığımız literatür taramalarında akciğer kanserli olgularda bu genle ilgili olarak metilasyon paternleriyle ilgili tek bir çalışma bulunmuştur. 2006 yılında Pateras ve arkadaşlarının(45) yaptığı bu çalışmada *p57* gen metilasyonunun *CDKN1B* geninin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Çalışmamızda *CDKN1B* geninin metilasyon oranı tümöral dokularda %4, çevre akciğer dokularında ise %5 olarak bulunmuştur. Yapılan çalışma sayısının az olması nedeniyle elde ettiğimiz bu veriler tam olarak değerlendirilememiştir.

*PTEN* (phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1) geni, 10q23.31 bölgesinde lokalize bir gen dir. Bu gen hücrelerin ekstra selüler matriks ile ilişkisini düzenlediği gibi, tümöral angiogenezini de kontrol eder. Soria ve arkadaşları(58) bu gendeki metilasyon değişimlerini KHOAK'li vakalarda araştırmışlar ve 125 hastanın 30'unda (%24) immünohistokimyasal yöntemlerle *PTEN* geninde ekspresyon kaybı saptamışlar ve ekspresyon kaybı saptanan hastalar içerisinde %35 oranında *PTEN* geninin metile olduğunu göstermişlerdir. Hosoya ve arkadaşlarının(26) yapmış oldukları başka bir çalışmada *PTEN* geninde %30 oranında metilasyon saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ise bu oran tümöral dokularda %4, çevre akciğer dokularında ise %9 olarak bulunmuştur. Bu gende görülen mutasyonlar ve epigenetik değişimler akciğer kanseri etyolojisinde yer almaktadır.

*VHL* (von Hippel-Lindau tumor suppressor) geni, 3p26-p25' de lokalize önemli tümör baskılayıcı genlerdendir. Bu gen özellikle ekstraselüler matriks formasyonunda ve hücre döngüsünde görev alır. Genin lokalize olduğu 3p bölgesi, akciğer kanserlerinde kromozomal değişimlerin en sık görüldüğü bölgelerdendir. Bu bölgedeki metilasyon değişimleri birçok kanserde gösterildiği halde akciğer kanserlerinde bu genin metilasyon profilinin çalışıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda *VHL* genindeki metilasyon oranı tümöral dokularda %4, çevre akciğer dokularında ise %7 olarak bulunmuştur. Bu verilerle önemli tümör baskılayıcı genlerden olan *VHL*' nin akciğer kanserlerinde daha ileri ve hassas çalışmalarla incelenmesi gerekliliği söylenebilir.

*CDH13* (cadherin 13, H-cadherin) geni 16q24.2 bölgesine lokalize, 14 ekzonlu bir genidir. Hücre tanıma, adezyonunda rol alan *CDH13*, vasküler yeniden düzenlenmede de önemli görevleri vardır.

Literatürde *CDH13*'ün metilasyon profili ile ilgili çalışmalarda da çok değişik oranlar göze çarpar. KHOAK'de Maruyama'nın çalışmalarında(40) %27 oranında *CDH13* metilasyonu saptanırken, bu oran Toyooka'da(54) %40, Kim'de(32) %43, Ulivi'de(66) ise %66 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise tümoral dokuda %7, çevre akciğer dokusunda da %15 oranında *CDH13* geni prob bölgesinde metilasyon saptandı. Bu oran diğer genlerdeki orandan farklı olarak, çevre dokulardaki metilasyonun tümoral dokudaki metilasyondan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir.

Bu grupta adı geçen *CASP8*, *CDKN1B*, *PTEN*, *VHL* ve *CDH13* genlerinin elde ettiğimiz veriler açısından önemleri, çevre akciğer dokularında tümoral dokulara oranla daha yüksek oranda metilasyon saptanmasıdır. Mikroskopik incelemelerinde kanser hücresi görülmeyen doku kesitleri çevre akciğer dokusu olarak çalışmaya dahil edilmiştir; ancak bu dokular tümoral dokulara komşudurlar. Bu nedenle, iki doku tipi arasında bu oranda metilasyon farkının ortaya çıkma nedeni kesitlerin alınımında yeterli sınırlamanın sağlanamamasından kaynaklanabileceği gibi, literatür bilgileri doğrultusunda kanserin erken dönemlerinde hatta kanser oluşmadan önce meydana gelen CpG adalarında beliren hipermetilasyondan da kaynaklanabilir. Ayrıca kanserli dokularda görülen genomik değişimler düşünüldüğünde büyük kromozomal kayıplar görülebilmektedir. Özellikle akciğer kanserlerinde 2p, 3p, 13q, 17p kromozomal bölgelerinde delesyonlar bildirilmiştir. Bu nedenle bu kromozomal bölgelerde yer alan tümör baskılayıcı genlerin kayıplarında metilasyon profilleri doru bir şekilde değerlendirilemeyecektir.

Yan ve ark.'larının (T1) 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (KGH) yöntemiyle akciğer tümör dokularındaki genomik değişimleri araştırmışlar ve özellikle 1p, 2q, 3p, 4p, 4q, 6p, 6q, 8p, 13q, 13p ve 16p kromozomal bölgelerinde delesyon saptamışlardır. Bu bölgeler içerisindeki en sık

değişimleri %56.4 oranıyla 3p , %53.8 ile 5q ve %51.3 ile 13q bölgelerinde göstermişlerdir.

Yoshino I ve arkadaşlarının(75) 49 adenokarsinomlu, 22 skuamoz hücreli karsinomlu akciğer kanseri hastalarında heterozigosite kaybını mikrosatellit markerlar kullanarak, *FHIT*, *p53*, *CDKN2*, *hMLH1*, *hMSH3* genlerini araştırmışlardır. Adenokarsinomlu vakaların %67'sinde, skuamoz hücreli karsinomlu vakalarında %90'ında heterozigosite kaybı saptanmıştır.

Sato M ve arkadaşları(51) 2002'de yaptıkları bir çalışmada küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserli olgularda *FHIT*, *CDKN2A*, *P14ARF*, *CDKN2B*, *PTEN*, *TP53* genlerinin homozigot delesyonlarını araştırmışlar ve olguların %59'unda bu genlerin 1 ila 6'sında homozigot delesyon bulmuşlardır.

Aynı zamanda bu kromozomal kayıpların incelenen tüm genlerdeki metilasyon oranlarının düşük çıkmasına neden olabileceği de düşünülebilir.

#### **5.1.11. BRCA2, DAPK1, TP73 ve FHIT Prob bölgelerinin metilasyonu:**

*BRCA2* (breast cancer 2)geni, 13q12 bölgesinde lokalize, histon asetil transfeaz aktivitesi olan bir DNA tamir genidir. *DAPK1* (death-associated protein kinase 1)geni 9q34.1 bölgesinde lokalize, apoptoziste önemli rolü olan bir genidir.*TP73* (tumor protein *p73*) genide 1p36 bölgeside bulunup, hücre büyümesini inhibe ederek apoptozisi sağlayan, *p53* ve benzeri genlerin transkripsiyonunu aktive eder. *FHIT* (fragile histidine triad gene)geni ise 3p14.2 bölgesine lokalize, mikroyübül ve tubulin fonksiyonlarını etkileyerek apoptozis ve hücre döngüsünde yer alan bir tümör baskılayıcı genidir.

Çalışmamızda bu genlere ait prob bölgelerinde herhangi bir metilasyon saptanmamıştır. Ancak literatürde başta *FHIT* olmak üzere bu genlerin metilasyon durumları ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bowman ve arkadaşlarının(3) KHOAK'li hastalarda yaptıkları bir çalışmada *DAPK1* geninde %19 oranında metilasyon saptamışlardır. Buna benzer olarak Fraipont ve arkadaşlarının(16) çalışmasında bu oran %22 olarak ortaya konmuştur. Yine aynı çalışmada *FHIT* geninde de %33 oranında metilasyon saptanmıştır. Kim ve arkadaşlarının(32) çalışmasında da *FHIT* geni için benzer bir oran %34 bulunmuştur.

## **5.2. Metilasyon Spesifik MLPA Yönteminin Literatürde En Sık Kullanılan Metilasyon Tarama Yöntemleriyle Karşılaştırılması**

MLPA yöntemi dünya ve ülkemiz için oldukça yeni bir yöntemdir. MLPA ile yapılmış çalışmalar henüz son 2-3 yıl içerisinde literatürde yayınlanmaktadır. Bu nedenle MLPA ile yapılan çalışmalarda elde edilen verilerin, karşılaşılan sorunların, yöntemin güvenilirliğinin daha net anlaşılabilmesi için benzer çalışma sayılarının artması gerekmektedir.

Literatürde akciğer kanserlerindeki metilasyon profillerinin incelendiği birçok çalışma olmasına karşın, MS-MLPA' nın kullanılarak yapılan bir çalışma henüz yayınlanmamıştır. Bu açıdan da bizim çalışmamız bu alanda yapılan ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Daha önceki yapılan araştırmalarda farklı teknikler kullanılarak bu araştırmalar yapılmıştır. Literatürde yayınlanan çalışmalarda en sık kullanılan MSP yöntemidir. Bu yöntemin temelindeki işlem, elde edilen DNA' nın bisülfite modifikasyonu, sitozinlerinin urasile çevrilmesidir. Metile olan sitozin ise urasile dönüşmeyecektir. Kullanılan spesifik dizayn edilmiş primerler ile amplifikasyon gerçekleşir. Bu yöntemin zorlukları arasında özellikle DNA' nın bisülfite ile modifikasyon basamağının uzun sürmesi, yüksek miktarda DNA gerekliliği ve oldukça zahmetli olması sayılabilir. Ayrıca istenen her gen bölgesi için ayrı PCR çalışmasının dizayn edilmesi, gerek zaman, gerek işgücü, gerekse maliyet açısından bir yük oluşturmaktadır. Bununla beraber MSP' nin değerlendirilmesi agaroz jel elektroforezi

hassasiyetinde olmaktadır. Bu da yöntemin güvenilirliğini etkilemektedir. Ayrıca MSP çalışmalarında mutlaka modifikasyonun olup olmadığının kontrolü için metile olduğu bilinen bir DNA örneğinin internal kontrol olarak çalışmada yer almalıdır. Ancak literatür taramalarımız sırasında bazı çalışmalarda bu konuya fazla dikkat edilmediğini gördük. Bu durumun sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini etkileyeceğini düşünmekteyiz.

Diğer bir metilasyon tarama yöntemi de RealTime PCR yöntemidir. Bu yöntemde de MSP ile aynı modifikasyon basamakları takip edilir. Dolayısıyla MSP' deki dezavantajlar bu yöntem içinde geçerlidir. Fakat güvenilirliği ve duyarlılığı MSP' ye göre yüksektir. Fakat yöntemin maliyeti oldukça yüksektir. İncelenen literatürlerde RealTime PCR yöntemiyle bulunan metilasyon oranları diğer çalışmalara göre daha yüksek olarak bildirilmiştir.

MS MLPA yöntemi incelenecek prob bölgelerinin hibridizasyonu, hedef dizilerin ligasyonu, metilasyon spesifik HhaI ile metile olmayan bölgelerin kesimi ve kesilmeyen bölgelerin amplifikasyonu esasına dayanır. Bu yöntemle tek reaksiyonda otuza yakın gen bölgesi incelenebilmektedir. Aynı zamanda bu yöntemde aynı hastadan HhaI enzimli ve enzimsiz 2 ayrı reaksiyon yapılması, probmixin içinde bulunan kontrol pikleri, ve her reaksiyon grubunda 4 sağlıklı bireyden elde edilen DNA örneklerinin kontrol olarak değerlendirilmesi ile 3 ayrı kontrol aşaması mevcuttur ki bu diğer yöntemlere göre bir avantaj olarak değerlendirilebilir. Aynı zamanda MS MLPA yönteminde az miktarda DNA yeterli olmaktadır. Buna ek olarak ihtiyaç duyulan teçizat ve maliyet açısından da kabul edilebilir seviyede bir yöntemdir. Tüm bu özellikleriyle MS MLPA birçok moleküler yöntem alternatif olabilecek potansiyele sahiptir.

Yöntemin dezavantajları incelendiğinde, kullanılan DNA kalitesi başta gelmektedir. Kullanılan DNA kaynağına göre sonuçlar arasında farklılıklar görülebilir. Kandan elde edilen DNA ile çalışıldığında elde edilen pik kalitesi ile dokudan elde edilmiş pik kalitesi arasında farklılıklar oluşmaktadır. Bu sorunu en aza indirmek için

çalışılacak hasta ve kontrol DNA'larının aynı materyalden elde edilmesi, DNA ekstrasyonun mümkün olduğu kadar aynı şartlarda ve aynı malzemelerle yapılması gibi çeşitli standardizasyon işlemleri uygulanmalıdır. Bizim çalışmamızda tümör dokusundan elde edilmiş DNA' lara ait pik görüntüsü ile aynı hastaya ait tümör dokusu içermeyen komşu akciğer dokularından elde edilen pik görüntüleri arasında bile farklılıklar gözlenmiştir. Bu nokta da karşılaştığımız en önemli problem, DNA miktarı düşük örneklerde genel pik düşüklüğü ve örneklerdeki sonlara doğru meydana gelen pik düşmeleridir. Bu problemin çözümünde dokudan tekrar daha yoğun DNA elde edilerek çalışmanın tekrar edilmesi olmuştur.

Çalışmamızda karşılaşılan en önemli problem, DNA miktarı düşük olan örneklerde saptanan pik kalitesinin değerlendirilemeyecek düzeyde olmasıydı. Ayrıca bazı örneklerde kapiller jel elektroforezinin ilk aşamalarında kaliteli pik elde edilirken devamında pik yüksekliğindeki düşüklükler analizlerin tekrarlanmasına neden oldu. Bu nedenle DNA miktarı ve kalitesi başarılı MS-MLPA analizi için çok önemlidir.

### **5.3. Metilasyon Spesifik MLPA Yönteminin Akciğer Kanselerinde Kullanılması**

Bu çalışmada kullanılan ME001B MLPA kiti çeşitli kanser türlerinde tanımlanmış tümör baskılayıcı genlerin metilasyon profillerini ortaya koymak üzere hazırlanmıştır. Probmixs içerisinde daha önce akciğer kanserleriyle ilişkilendirilmiş genler yanında diğer kanserlerle ilişkilendirilmiş ancak henüz akciğer kanserlerinde araştırılmamış genlere ait problemler de mevcuttur. Örneğin *VHL* genindeki metilasyon profilinin incelendiği akciğer kanser çalışmasına rastlanmamıştır. Ancak çalışmamızda *VHL* geninin gerek tümör dokusu gerekse çevre dokularda saptanan %4 ve %7'lik metilasyon oranları adı geçen genin KHOAK gelişiminde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

MS-MLPA tekniğinin hızlı bir şekilde birçok genin metilasyon profilini aynı anda incelemesi sayesinde kanserin genomik taramalarında kullanımı sağlayacaktır. Özellikle literatürlerde belirtildiği gibi kanserin erken dönemlerinde CpG adalarında meydana gelen hipermetilasyonun balgam ve kandan elde edilecek DNA örnekleriye akciğer kanserinin genomik taramalarındaki önemi bilindiğinden MS-MLPA gerek kolay uygulanabilirliği, gerek sonuç alma süresinin kısalığı gerekse maliyetinin düşük olması ile bu alanda yaygın bir kullanım alanı bulacaktır.

Ancak çalışmada elde ettiğimiz sonuçların literatürdeki diğer oranlara göre düşük saptanması, her genin promoter bölgesinde incelenen CpG adacık bölgeleri ile diğer çalışmalarda incelenen bölgeler arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz. Bunun yanı sıra yöntemin hassasiyeti konusunda daha yüksek vaka sayılı ve yöntemin diğer yöntemlerle konfirmasyonunu içeren çalışmalara ihtiyaç olduğunu işaret etmektedir.

## **6. SONUÇ ve ÖNERİLER**

Çalışmada KHOAK'lerinde, parafine gömülü 100 tümör dokusundan ve 100 çevre akciğer dokusundan elde edilen DNA örnekleri, akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiş 24 farklı genin metilasyon profilleri MS-MLPA yöntemiyle incelenerek literatür ile uyumları karşılaştırıldı.

Bu çalışmada elde edilen ilk kazanım, başarılı bir MS-MLPA çalışması için kullanılacak DNA miktarının ve kalitesinin öneminin anlaşılması olmuştur. Parafinize dokulardan DNA izolasyonunda yeterli ve kaliteli DNA elde ederken çeşitli sorunlarla karşılaşmış ve mevcut protokoller üzerinde modifikasyonlar uygulanarak bu sorunlar çözülmüştür. Yeterli ve kaliteli DNA eldesinin başarılı bir MS-MLPA uygulamasındaki en önemli aşama olduğu belirlenmiştir. DNA miktarının yetersiz ve kirli olması elde edilen piklerin kalitesini düşürmekte ve pik analizinde sıkıntılara, yanlış-pozitif ya da yanlış-negatif sonuç alınmasına neden olmaktadır.

MS MLPA tekniği, hızlı bir şekilde birçok genin metilasyon profilini aynı anda inceleyebilen, etkin, ucuz, kolay ve hızlı bir yöntemdir. Aynı anda çok sayıda gen bölgesinin analizi gerçekleştirilebilmektedir. Deneyimlerimiz doğrultusunda metilasyon paternlerinin incelendiği diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında iş, zaman ve maliyet açısından MS-MLPA yönteminin diğer yöntemlere göre çok daha ekonomik olduğu gözlenmiştir. Ancak MS-MLPA'nın duyarlılığı ve hassasiyetinin belirlenmesi için geniş araştırma popülasyonlarında farklı yöntemlerin aynı zamanda uygulanması ve sonuçların karşılaştırılması gerektiği görüşündeyiz.

Çalışılan tümör ve çevre akciğer dokularında özellikle *CDKN2B*, *BRCA1*, *CDH13*, *HIC1* genleri başta olmak üzere *TIMP3*, *ATM*, *CDKN1B*, *PTEN*, *CD44*, *RASSF1*, *VHL*, *ESR1* ve *IGSF4* genlerine ait prob bölgelerinde metilasyon saptanmıştır. *APC*, *CDKN2A*, *MLH1*, *RARB*, *CHFR*, *GSTP1* genlerine ait prob bölgelerinde yalnızca hastaların tümöral dokularına ait prob bölgelerinde metilasyon saptanırken, *CASP8*



genine ait prob bölgesinde sadece çevre akciğer dokularında metilasyon görülmüştür. Ayrıca ME001 probmiksi içinde bulunan *BRCA2*, *DAPK1*, *TP73* ve *FHIT* genlerine ait prob bölgelerinde ise gerek tümoral gerekse çevre akciğer dokularında metilasyon görülmemiştir. Bu bulgular KHOAK'lerde tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kayıplarında gen mutasyonlarının yanı sıra hipermetilasyon mekanizmalarının da etkili olduğunu göstermiştir. Çalışmada elde edilen frekanslar, literatürde belirtilen sıklıklarla birlikte değerlendirildiğinde tümörel heterojenite dikkat çekiciydi. Aynı analiz yönteminin kullanıldığı araştırma populasyonlarında dahi metilasyon sıklığında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir.

Çalışmamız, metilasyon analizlerinin MS-MLPA ile değerlendirildiği ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Dünya literatüründe MS-MLPA yönteminin akciğer kanserlerinde uygulanmasına ilişkin bir çalışmaya rastlanmadığından elde edilen bulgular bu alandaki çalışmalar için bir temel niteliğindedir. Ayrıca, çalışmada değerlendirilen *VHL* ve *CD44* gibi tümör baskılayıcı genlerin KHOAK tümörlerinde metilasyon paternleri açısından incelenmeleri de bilgilerimiz doğrultusunda ilk olma niteliği taşımaktadır. Bu genlerden özellikle *VHL* geni hipermetilasyonunun KHOAK olgularında detaylı olarak incelenmesi gerektiği düşüncesindeyiz. Çünkü gerek tümör dokusu gerekse çevre dokularda *VHL* hipermetilasyon sıklığı, çalışmamızda incelenen toplam 24 gene ilişkin sıklıklar birlikte değerlendirildiğinde pek çok gene ilişkin hipermetilasyon sıklığından daha yüksekti.

Çalışma verilerimizde saptanan frekans değerleri, MS-MLPA yöntemi ile incelenen çalışma olmaması nedeniyle farklı yöntemlerle elde edilen oranlarla karşılaştırılmıştır. Serimizde hipermetilasyon sıklığı genellikle literatürdeki oranlara göre düşük bulunmuştur. Bunun nedenleri arasında; kullanılan yöntemlerin farklılığı en önemli etkidir. Diğer taraftan, çalışmamızda incelenen her genin promotör bölgesinde incelenen CpG adacık bölgeleri ile diğer çalışmalarda incelenen bölgeler arasındaki farklılıkların da metilasyon frekansındaki çeşitlilikte önemli olduğu düşüncesindeyiz. Bu faktörün, literatürde aynı yöntemle elde edilen verilerdeki heterojeniteyi de açıkladığını düşünüyoruz. Serimizde incelenen 24 genin farklı CpG adacık bölgelerinin değerlendirilmemesi, çalışmamızda eksik olan yöndü. Bu çalışmanın devam eden

sürecinde aynı genlerin farklı bölgelerinin de metilasyon açısından değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Tümör dokusu ile çevre dokulardaki metilasyon sıklıkları birlikte değerlendirildiğinde; histopatolojik olarak normal olan çevre dokularda da sıklığın yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu yüksek sıklık, rezeksiyon alanının dar-geniş tutulması tartışmasını gündeme getirdiği gibi tümör oluşumundaki moleküler mekanizmalar açısından da önemlilik arz etmektedir. Tümör baskılayıcı gen hipermetilasyonu tümör gelişimine yatkın hücrelerde erken gelişen bir olay mı? sorusu yanıt beklemektedir.

Çalışmaya dahil edilen farklı gradelere ilişkin olgu sayısı, incelenen 24 farklı genin her biri için yeterli olmadığından farklı gradelerde her genin metilasyon sıklıklarını karşılaştırma ve KHOAK karsinogenezis sürecinde metilasyon mekanizmasının tümör progresyonundaki yeri konusunda bir değerlendirme yapılamamıştır. Ancak GI ve GII olgularını erken grade ve GIII olgularını ileri grade olarak gruplandırdığımızda, ileri grade olgularda hem tümöral dokularda hem de çevre akciğer dokularında incelediğimiz genlerin daha sık oranda metile olduğunu saptadık. *TIMP3*, *APC*, *CDKN2A*, *MLH1*, *ATM*, *RARB*, *CHFR*, *CASP8*, *CDKN1B*, *VHL1*, *RASSF1*, *ESR1*, *IGSF4* ve *GSTP1* genlerinde erken gradeli olgularda ne tümöral dokuda ne de çevre akciğer dokularında hiç metilasyon saptanmazken, ileri gradeli olgularda değişik oranlarda metilasyon saptanmıştır.

Çalışmamız MS-MLPA ile kanser alanında yapılmış ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Bu nedenle benzer çalışmaları planlayan birçok araştırmaya ışık tutacaktır. Benzer çalışmalardan elde edilecek verilerle yöntemin sensitivite ve spesivitesi ile ilgili daha kapsamlı verilere sahip olunacaktır. Ayrıca elde edilen sonuçların diğer metilasyon tarama yöntemleriyle karşılaştırılması buna yardımcı olacaktır.

Sonuç olarak bir reaksiyonda çok fazla sayıda genin metilasyon profilini aynı anda inceleyebilen MS-MLPA yönteminin akciğer kanserlerinin metilasyon profillerinin taranmasında kullanılabilir, ucuz ve hızlı sonuç verebilen önemli bir

moleküler teknik olduğu ve kanserin genomik taramalarında da kullanılabileceği düşüncesindeyiz.

Son yıllarda akciğer kanserlerinin erken tanı ve genomik taramasında, gerek kandan gerekse balgamdan elde edilen DNA örneklerinden bazı tümör baskılayıcı genlerin metilasyon profillerinin araştırıldığı çalışmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda MS-MLPA yönteminin diğer metilasyon tarama yöntemleriyle karşılaştırılarak en kısa süre içerisinde sensivite ve spesivitesinin belirlenmesi ve akciğer kanserinin erken tanısında rol oynayan markerlere özgü kit dizaynları yapılarak rutin kullanıma geçirilmesinin gerekli olduğuna inanmaktayız.

## **KAYNAKLAR**

1. Akpınar, O., Akciğer kanseri epidemiyolojisi ve etyolojisi, Akciğer Kanserleri, Ege Üniversitesi Kanserle Savaş Araştırma Uygulama Merkezi, 1996:3-13.2 s.
2. Arvind, K., Tsou, J.A., Siegmund, K.D., Shen, Y.C., et al., 2002, Hierarchical clustering of lung cancer cell lines using NA methylation marker, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and prevention*, 11, 291-297 p.
3. Bowman, R.V., Yang, I.A., Semmler, A.B.T., Fong, K.M., 2006, Invited review series: lung cancer, *Respirology*, 11, 355-365 p.
4. Bunn, P.A., 2000, Epidemiologic aspects of lung cancer. *Cancer, J. Clin.*, 50,7, 33-46 p.
5. Collins, K., 1997, The cell cycle and cancer, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 7, 2776-2778 p.
6. Corn, P.G., Summers, M.K., Fogt, F., et al., 2003, Frequent hypermethylation of the 5' CpG island of the mitotic stress checkpoint gene Chfr in colorectal and non small cell lung cancer, *Carcinogenesis*, 24, 1, 47-51 p.
7. Dammann, R., Strunnikova, M., Schagdarsurengin, U., Rastetter, M., et al., 2005, CpG island methylation and expression of tumour-associated genes in lung carcinoma, *European Journal of Cancer*, 41, 1223-1236 p.
8. Davidson, B.J., Hsu, T.C., Schantz, S.P., 1993, The genetics of tobacco induced malignancy, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 119, 1198-1205 p.
9. Echimane, A.K., Ahnoux, A.A., Adoubi, I., Hien, S., M'Bra, K., D'Horpock, A., Diomande, M., Anongba, D., Mensah-Adoh, I., Parkin, D.M., 2000, Cancer incidence in Abidjan, Ivory Coast: first results from the cancer registry, 1995-1997, *Cancer*, 1, 89, 653-663 p.
10. Ehrlich, M., 2006, Cancer-linked DNA hypomethylation and its relationship to hypermethylation, *Curr Top Microbiol Immunol*, 310, 251-274 p.
11. Etseller, M., et al., 2001, A gene hypermethylation profile of human cancer, *Cancer Res*, 61, 8, 3225-3229 p.

### **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

12. Eunice, C.C., Lam, S.Y., Fu, K.H., Kwong, Y.L., 2005, Polymorphisms of the GSTM1, GSTP1, MPO, XRCC1 and NQO1 genes in Chinese patients with non small cell lung cancers: relationship with aberrant promoter methylation of the CDKN2A and RARB genes, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 162, 10-20 p.
13. Fırat, D., Çelik, İ., 1998, *Cancer Statistics in Turkey and in the World 1993-1995*, Turkish Association For the Cancer Research and Control, Ankara
14. Field, J.K., Selection and validation of new lung cancer markers for the molecular pathological assessment of individuals with a high risk of developing lung cancer. In: Brambilla C, Brambilla E, eds. *Lung tumors fundamental biology and clinical management*, 1999, Marcel Dekker Inc., New York, 287-302 p.
15. Fong, K.W., Sekido, Y., Minna, J.D., 1999, Molecular pathogenesis of lung cancer, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 118, 1136-1152 p.
16. Fraipond, F., Sibilot, D.B., Michelland, S., et al., 2005, Promoter Methylation of genes in bronchial lavages: a marker for early diagnosis of primary and relapsing non small cell cancer, *Lung Cancer*, 50, 199-209 p.
17. Franzmann, E.J., Rearegui, E.P., Carraway K.L., et al., 2005, Salivary soluble CD44: A potential molecular marker for head and neck cancer, *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev*, 14,3, 735-739 p.
18. Fronaka, O., Takeshima, Y., Awaya, H., et al., 2004, Aberrant methylation of p14, p15 and p16 genes and location of the primary site in pulmonary squamous cell and carcinoma, *Pathology International*, 54, 549-555 p.
19. Garrett, M.D., 2001, Cell cycle control and cancer, *Current Science*, 81, 5, 515-522 p.
20. Geoffey, M.C., Hausman, E.R., *Hücre: Moleküler Yaklaşım*, 2006, (Çev.: Sakızlı M., Atabey N.), İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 592-640 s.
21. Grenle, R.T., Murray, T., Bolden, S., Wingo, P.A., 2000, Cancer statistics 2000.CA, *Cancer J.Clin.*, 50, 7-33 p.
22. Groeger, A.M., Esposito, V., Mueller, M.R., et al., 1997, Advances in the understanding of lung cancer, *Anticancer Research*, 17, 2519-2522 p.

### **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

23. Grote, H.J., Schmiemann, V., Geddert, H., Rohr, U.P., et al., 2005, Aberrant promoter methylation of p16, RARB2 and SEMA3B in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer, *Int. J. Cancer*, 116, 720-725 p.
24. Hastürk, S., 2000, Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi. In: Hastürk S, Yüksel M eds, Akciğer Kanseri, İstanbul, 1-27 s.
25. Heasley, L.E., Johnson, G.L., Signal transduction abnormalities in lung cancer. In: Kane MA, Bunn PA, eds. *Biology of lung cancer*. 1998, , Marcel Dekker Inc., New York, 371-390 p.
26. Hosoya, Y., Gemma, A., Seike, M., et al., 1999, Alteration of the PTEN/MMAC1 gene locus in primary lung cancer with distant metastasis, *Lung Cancer*, 25, 87-93 p.
27. <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas>
28. Jacobson, D.R., Ras mutations in lung cancer. In: Brambilla C, Brambilla E, eds. *Lung tumors fundamental biology and clinical management*. 1999, Marcel Dekker Inc., New York, 139-156 p.
29. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., et al., 2006, Cancer statistics, *JA. Cancer J Clin*, 56, 106-130 p.
30. Karlıkaya, C., Akciğer Kanseri Ders Notları
31. Kaufmann, W.K., et al., 1993, Cell cycle control, DNA repair and initiation of carcinogenesis, *FASEB*, 7, 12, 1181-1191 p.
32. Kim, S.D., Cha, S.I., Lee, J.H., et al., 2007, Aberrant DNA Methylation profiles of non small cell lung cancer in a Korean population, *Lung Cancer*, 2749, 1-6 p.
33. Knudson, A., 1971, Mutation and cancer, statistical study of retinoblastoma, *Proc Natl Sci USA*, 64, 4, 820-823 p.
34. Koulibaly, M., Kabba, I.S., Cissé, A., Diallo, S.B., Diallo, M.B., Keita, N., Camara ND, Diallo MS, Sylla BS, Parkin DM, *Int J Cancer*. 1997. Cancer incidence in Conakry, Guinea: first results from the Cancer Registry 6, 39, 45, 1992-1995 p.

### **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

35. Kim, K.S., Nelson, H.H., Lemos, M., Godleski, J.J., et al., 2006, Homozygous deletion of p16 and tobacco carcinogen exposure in nonsmall cell lung cancer, *Int. J. Cancer*, 118, 1364-1369 p.
36. Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., Robbins Temel Patoloji, 2003, (Çev: Çevikbaş U.), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 172-195 s.
37. Kuramochi, M., Fukuhara, H., Nobokuni, T., et al., 2001, TSLC1 ,is a tumor supressor gene in human non small cell lung cancer, *Nature Genetics*, 27, 427-430 p.
38. Lecture, G.F.F., 1996, Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors, *Chest*, 109, 14-19 p.
39. Mariatos, G., Bothos, J., Panayotis, Z., et al., 2003, Inactivating mutations targeting the chfr mitotic checkpoint gene in human lung cancer, *Cancer Reseach*, 63, 7185-7189 p.
40. Maruyama, R., Sugio, K., Yoshino, I., Maehara, Y., Gazdar, A.F., 2004, *American Cancer Society*, 100, 7, 1472-1477 p.
41. Murakami, Y., 2005, Involvement of a cell adhesion molecule TSLC1/IGSF4 in human oncogenesis, *Japanese Cancer Association*, 96, 9, 543-552 p.
42. Murthy, S.K., 2002, Loss of heterozygosity associated with uniparental disomy in breast carcinoma, *Mod Pathol*, 15, 12, 1241-1250 p.
43. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., Thompson&Thompson *Tıbbi Genetik*, 2005, Güneş Kitabevi, 312-313 s.
44. Palmisano, W.A., Divine, K.K., Saccomanno, G., et al., 2000, Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum, *Cancer Res*, 60, 5954-5958 p.
45. Pateras, I.S., Apostolopoulou K., Koutsami M., et al., 2006, Downregulation of the KIP family members p27 and p57 by SKP2 and the role of methylation in p57 inactivation non small cell lung cancer, *International Journal of Cancer*, 119, 11, 2546-2556 p.
46. Rabiasz, G.J, Langdon, S.P, Bartlett, J.M.S, 1992, Growth control by epidermal growth factor and transforming growth factorin human lung squamous carcinoma cells, *Br. J. Cancer*, 66, 254-259 p.

### **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

47. Robert, K.M, Peter, A.M., Granner, D.K, Rodwell, V.W., Harper' s Biochemistry, 1990, Appleton and Lange, 819-820 p.
48. Roth, J.A., Molecular events in lung cancer. Lung Cancer 1994,10 3s-15s.
49. Safar, A.M., Spencer, H., Su, X., Cooney, C.A., Shwaiki, A., Fan, C.Y., 2007, Promoter hypermethylation for molecular nodal staging in non small cell lun cancer, Arch Pathol Lab Met, 131, 936-941 p.
50. Safar, A.M., Spencer, H., Su, X., Coffey M., Cooney CA.,2005, Methilation profilling of archived non-small cell lung cancer: a promising prognostic system, Clin Cancer Res, 11, 12, 4400-4405 p.
51. Sato, K., Morishita, Y., Fukasawa, M., et al., 2004, Anthracotic index and DNA methylation status of sputum contents can be used for identifying the population at risk of lung carcinoma, Cancer Cytopathology, 102, 6, 348-354 p.
52. Schouten, J.P., McElgunn, C.J, Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G., 2002, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, Nucleic Acids Research, 30-57 p.
53. Sato, M., Shames D.S., Gazdar A.F., Minna J.D., 2007, A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer, Journal of Thoracic Oncology, 2, 327-343 p.
54. Shinichi, T., Toyooka, K.O., Maruyama, R., et al., 2001, DNA methlation profiles of Lung Tumors, Molecular Cancer Therapeutics, 1, 61-67 p.
55. Siegfried, J.M., et al., Growth factors and receptors in non small cell lung cancer, 1999, Marcel Dekker Inc., New York, 317-336 p.
56. Siegfried, S.M., 1999, Biology and chemoprevention of lung cancer, Chest, 113, 40S-45S p.
57. Slater, H.R, Bruno, D.L, Ren, H., Pertile, M., Schouten, J.P, Choo, K.H.A, 2003 Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA), J. Med. Genet., 40, 907-912 p.



### **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

58. Soria, J.C., Lee, H.Y., Lee, J.I., et al., 2002, Lack of PTEN expression in non small cell lung cancer could be related to promoter methylation, *Clinical Cancer Research*, 8, 1178-1184 p.
59. Shivapurkar, N., Stastny, V., Suzuki, M., Wistuba, I., Li, L., Zheng, Y., 2007 Application of methylation gene panel by quantitative PCR for lung cancer, *Cancer Letters*, 247, 56-71 p.
60. Sugimura, T., et al., 2000, Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis, *Mutat Res*, 462, 2, 3, 235-246 p.
61. Takanami, I., Imamura, T., Hashizume, T., 1996, Expression of PDGF, IGF-II, bFGF and TGF- $\beta$ 1 in pulmonary adenocarcinoma. *Path Res Pract*, 192, 1113-1120 p.
62. Tchia, M.M., Holmes, M.D., McLennan, G., 1991, The molecular biology of lung cancer, *Med. J. Australia*, 154, 501-503 p.
63. Thiagalingam, S., et al., 2002, Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence, *Curr Opin Oncol*, 14, 1, 65-72 p.
64. Tomizawa, Y., Lijima, H., Nomoto, T., et al., 2004, Clinicopathological significance of aberrant methylation of RARB2 at 3p24, RASSF1A at 3p21.3, and FHIT at 3p14.2 in patients with non small cell lung cancer, *Lung Cancer*, 46, 305-312 p.
65. Tsou A.J., Shen, L.Y.C., Siegmund K.D., et al., 2004, Distinct DNA methylation profiles in malignant mesothelioma, lung adenocarcinoma and non tumor lung,
66. Ulivi, P., Zoli, W., Calistri, D., Fabbri, F., et al., 2006, p16 and CDH13 hypermethylation in tumor and serum of non small cell lung cancer patients, *Journal of Cellular Physiology*, 206, 611-615 p.
67. Wei Q, Spitz MR. The role of DNA repair capacity in susceptibility to lung cancer: A review. *Cancer and Metastasis Reviews* 1997;16, 295-307 p.
68. WHO “World Cancer Report”, 2003, Genova (<http://www.who.int/cancer/en/>)
69. William, S.K., Cummings, M.R., *Genetik Kavramlar*, 2000, (Çev.: Öner C.), Palme Yayıncılık, Ankara, 635-636 p.

### **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

70. [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)
71. [www.turkcancer.org](http://www.turkcancer.org)
72. [www.ygh.gov.tr](http://www.ygh.gov.tr)
73. Yan, W.S., Song, L.Y., Wei, W.D., Li, A., Liang, Q.W., Liu, J.H., Fang, Y., 2005, Chromosomal imbalance in primary lung squamous cell carcinoma and their relationship with smoking, *Ai Zheng*, 24, 1, 47-52 p.
74. Yegnasubramanian, S., Kowalsky, J., Gonzalgo, M.L., et al., 2004, hypermethylation of CpG islands primeri and metastatic human prostate cancer, *Cancer Res.*, 64, 6, 1975-1986 p.
75. Yoshino, I., Osoegawa, A., Yohena, T., Kameyama, T., Oki, E., Maehara, Y., 2005, Loss of Heterozygosity (LOH) in non small cell lung cancer: differenece between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, *Respiratory Medicine*, 99, 308-312 p.

## ÖZGEÇMİŞ

### Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Ahmet ULUDAĞ  
Doğum Tarihi ve Yeri : 05. 09. 1978 Eskişehir  
Uyruğu : T.C.  
Medeni Durumu : Evli  
İletişim Adresleri  
:Büyükdere Mah. Atatürk Bulvarı Berkay Sitesi B Blok  
D:12 No:245 Eskişehir  
[:drahmetuludag@yahoo.com](mailto:drahmetuludag@yahoo.com)  
:0.532.495 80 74

### Eğitim Durumu:

İlkokul : Eskişehir Porsuk İlköğretim Okulu-1989  
Ortaokul : Eskişehir Anadolu Lisesi  
Lise : Eskişehir Anadolu Lisesi -1996  
Üniversite : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi -2002

**Üye Olunan Bilisel Kuruluşlar:** Tıbbi Genetik Derneği