

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ŞÜKRÜ PALANDUZ

PARAFİN İÇİNDE SAKLANAN MALİGN MELANOM BİYOPSİ
ÖRNEKLERİNDE P53 GENİNİN DGGE VE DİZİ ANALİZİ; P16,
RETİNOBLASTOMA VE CDK4 GENLERİNİN FISH YÖNTEMİ
İLE İNCELENMESİ

TIBBİ GENETİK DOKTORA TEZİ

118829

DR. KIVANÇ ÇEFLE

İSTANBUL - 2002

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSLARARASI YAYIN NO: 118829

TEŞEKKÜR

Bu tezin ortaya çıkmasında; bilgisi, yol göstericiliği ve teşvikleri ile her zaman yanımda olan, gerekli çalışma olanaklarının sağlanmasında hiçbir yardımını esirgemeyen tez danışmanım sayın Doç. Dr. Şükrü Palanduz'a,

Gerek teorik, gerekse uygulamaya yönelik birikimi ile tezimin laboratuvar aşamasında büyük yardımını gördüğüm sayın Yard. Doç. Dr. Nedime Serakıncı'ya,

Tez çalışmalarımın devamı süresince beni destekleyen sayın Doç. Dr. Şükrü Öztürk ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

En içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Kıvanç Çefle

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. MALİGN MELANOM	3
2.2. MALİGN MELANOM GENETİĞİ: P16, P14 ^{ARF} VE CDK4 GENLERİ	7
2.3. RETİNOBLASTOMA VE RETİNOBLASTOMA TÜMÖR SÜPRESÖR GENİ	15
2.4. P53 TÜMÖR SÜPRESÖR GENİ	18
2.5. ÇALIŞMADA KULLANILAN LABORATUVAR YÖNTEMLERİ	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. HASTALAR	33
3.2. YÖNTEMLER	34
4. SONUÇLAR	45
4.1. P53 GENİ (DGGE VE DİZİLEME)	45
4.2. P16, RETİNOBLASTOMA VE CDK4 GENLERİ (FISH)	53
5. TARTIŞMA	64
5.1. P53 GENİNİN DGGE VE DİZİLEME İLE DEĞERLENDİRİLMESİ	64
5.2. P16, RETİNOBLASTOMA VE CDK4 GENLERİNİN FISH İLE DEĞERLENDİRİLMESİ	67
6. SONUÇ VE ÖZET	72
7. CONCLUSION AND SUMMARY	74
8. KAYNAKLAR	76
9. EKLER	90
9.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDE, KİT VE CİHAZLAR	90
9.2. KULLANILAN PRİMERLER	91
9.3. KISALTMALAR	92

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Malign melanom, çok eski çağlardan beri bilinen habis bir deri tümörüdür. Moleküler biyoloji tekniklerindeki hızlı ilerlemelere rağmen, melanom oluşumunda rol oynayan genetik değişiklikler diğer kanserlere göre çok daha az bilinmektedir. Bu durum, malign melanomun bazı araştırmacılar tarafından “genetik kara kutu” olarak adlandırılmasına yol açmıştır(1). Görülme sıklığının büyük bir hızla artıyor olması malign melanomun önemini daha da arttırmaktadır (2).

Melanom genetiği üzerinde yapılan ilk çalışmalar iki grupta toplanabilir: 1-Ailevi melanomlarda yapılan bağlantı analizi çalışmaları (3); 2-sporadik olgularda tümör dokusunda ve tümör hücre soylarında yapılan sitogenetik ve moleküler genetik incelemeler (4). Bu araştırmaların sonucunda 9. kromozomun kısa kolunda (9p21) bulunan p16 tümör süpresör geninin ailevi olguların bir kısmında (%20) nokta mutasyonu ve sporadik olguların da yaklaşık %20'sinde homozigot delesyona uğradığı anlaşılmıştır (5, 6). Diğer yandan bir başka tümör süpresör geni olan p53'ün bir çok kanser türünde mutasyona uğradığının gösterilmesi, p53'ün melanom gelişiminde de rol oynayabileceğini düşündürmüştür(7). Gerçekten de, immünohistokimyasal boyama yöntemlerine dayanan ilk çalışmalar, melanomdaki p53 proteininin mutant karakterde olduğu izlenimini vermiştir (8). Ancak, bunun aksine, daha sonraki tarihlerde SSCP (single strand conformational polymorphism) tekniğine dayanan gen düzeyindeki incelemeler, malign melanomlarda p53 mutasyonunun nadir olduğunu göstermektedir (9, 10, 11, 12).

Malign melanomda rol oynaması muhtemel bir diğer tümör süpresör geni retinoblastoma'dır. Bu genin germline mutasyonları ailevi retinoblastoma'ya yol açmaktadır. Ailevi retinoblastoma, malign melanom yatkınlığı da yaratmaktadır (13, 14). Retinoblastoma geni bir çok sporadik tümörde nokta mutasyonu ve hemizigot delesyonla biallelik kayba uğramaktadır (15, 16, 17, 18, 19). Malign melanomda delesyonlarının nadir olduğu bildirilmekle birlikte bu konuda yapılan çalışmaların sayısı azdır(20).

CDK4 (*cyclin dependant kinase 4*) p16 tümör süpresör geni tarafından baskılanan ve hücre siklusunun sürdürülmesinde rol alan bir onkogendir(5). Bazı ailevi melanom olgularında CDK4

geninde germline mutasyon saptanmaktadır; bu mutasyon CDK4'ün p16 ile etkileşimini engellemektedir (21). Bu gözlem, CDK4'ün sporadik melanom olgularında da rol oynayabileceğini düşündürmektedir. CDK4 gen amplifikasyonunun melanomda nadir olduğu bildirilmektedir, ancak bu konudaki çalışmaların sayısı azdır (22).

Bu çalışmada, malign melanomlu 15 hastanın parafin blok içinde saklanan biyopsi örneklerinde, bir mutasyon tarama yöntemi olan DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) ile p53 mutasyonları araştırılmıştır. DGGE, mutasyonları saptamak yönünden hassasiyeti %100'e yakın bir yöntemdir(23); bu nedenle malign melanomda p53'ün mutasyon sıklığını SSCP'ye göre daha güvenilir olarak göstereceği düşünülmüştür. FISH tekniği ile de aynı örneklerde p16 ve retinoblastoma tümör süpresör genlerinin delesyon ve CDK4 onkogeninin amplifikasyon durumları araştırılmıştır. Bu araştırma ile söz konusu genlerdeki değişikliklerin malign melanom patogenezindeki öneminin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MALİGN MELANOM

2.1.1 Tarihçe

Malign melanom, derinin epidermis tabakasında bulunan melanositlerden gelişen habis bir deri tümörüdür. Muhtemelen çok eski çağlardan beri bilinmektedir; milattan önce beşinci yüzyılda Hipokrat “metastaz yapan ölümcül siyah tümörler” den söz etmiştir. Bununla birlikte, bir hastalık olarak melanomu ilk kez fransız hekim Renè Laennec Paris’te, Faculté de Médecine’de 1806 yılında yaptığı bir konuşmada tanımlamıştır. Yazılı literatürde de “melanom” sözcüğünü ilk kez kullanan -bir olgu sunumunda- yine Laennec’tir (*Extrait au memoire de M Laennec, sur les melanoses. Bull Ec Soc. Med. 24, 1812*). Bir pratisyen hekim olan William Norris ise melanomun kalıtsal yönü üzerinde durmuştur (1). 1820 yılında tanımladığı bir olguda, tümörün önceden var olan bir “ben”den geliştiğini kaydetmiş, indeks olgunun çocuklarının, erkek kardeşlerinin ve “benzer bir hastalık” neticesinde ölen babasının vücudunda çok sayıda “ben” olduğunu bildirmiştir. Norris, “kalıtsal” bir hastalıkla karşı karşıya olduğu kanısına varmıştır (*Norris W. 1820. A case of fungoid disease. Edinb. Med. Surg. 16:562-565*).

2.1.2. Epidemiyoloji

Melanom insidansı yaşla birlikte artmaktadır (24). Genel yıllık insidans ise coğrafi konuma göre değişmektedir: Avustralya’da 40/100000 iken kuzey Avrupa’da 5/100000’den azdır (3). Avustralya ve Yeni Zelanda’da en sık 4. kanser türüdür; buna karşılık iskandinav ülkeleri ve İngiltere’de sırasıyla 10. ve 18. sıraya düşmektedir. Koyu renk tenli Avrupa dışı toplumlardaki insidansı ise 0.1-3/100000 arasında değişmektedir. İnsidans artış oranı ten rengi açık toplumlarda özellikle yüksektir ve %3-7 arasında değiştiği bildirilmiştir (3). Malign melanom, kadınlarda görülen akciğer kanserinden sonra dünyada en hızlı artan ikinci kanser türüdür; sıklığı son 60 yılda 15 kat artmıştır (1, 25, 26, 27).

Malign melanomdan kaynaklanan genel mortalite sıklığı artmakla birlikte mortalitedeki artış hızı, insidans artış hızının gerisinde kalmıştır: kuzey Avrupa ülkelerinde 1-3/100000; hastalığın çok daha sık görüldüğü Avustralya ve Yeni Zelanda’da ise 10/100000’dur. Hastalığa yakalananlar arasındaki mortalite oranı da son dekadlarda düşme eğilimi göstermiştir (2000 yılı rakamlarına göre %20 ya da daha az). İnsidansın yüksek olduğu ülkelerde erkekler ve kadınlar

yaklaşık eşit oranda etkilenirken düşük insidans bölgelerinde daha çok kadınlar hastalığa yakalanmaktadır (2).

2.1.3. Risk Faktörleri

I. Yapısal (konstitüsyonel): En önemli yapısal risk faktörü cilt rengidir . Cilt rengi açıklaştıkça melanom riski de artmaktadır. Bu durum, muhtemelen melanositlerin ürettiği melanin pigmentinin ultraviyole ışıklardan koruyucu etkisi ile ilgilidir; bu pigmentin az üretildiği açık ten renkli kişiler, ultraviyolenin karsinogenetik etkisine korunmasız hale gelmektedirler (25). Güneş ışığına maruz kaldıklarında “bronzlaşamayan” bireylerde de melanoma yakalanma eğilimi artmıştır (28). Çok sayıda edinsel ve displastik nevüslerin varlığı melanoma yatkınlık oluşturmakla birlikte melanomların yalnızca %30'u nevüs zemininde gelişmektedir; %70'i *de novo* olarak normal deriden çıkmaktadır (2, 29). Deride çillenme eğilimi, güneş yanığı hikayesi, ailede melanomlu bireylerin bulunması ve yaş diğer önemli risk faktörleridir. Yaş ile melanom riski arasındaki pozitif korelasyon muhtemelen yaşlı bireylerin karsinogen etkilere (güneş ışığı) daha uzun süre maruz kalmasına ve ilerleyen yaşla birlikte DNA tamir yeteneğinin azalmasına bağlıdır (25, 30).

II. Çevresel: En önemli çevresel risk faktörü güneş ışığına maruz kalınmasıdır (31). Açık renk tenli toplumlarda melanom riski yerleşim bölgesinin ekvator hattına olan uzaklığı ile ters orantı göstermektedir. Bu da, nüfuslarının çoğunluğunu İngiltere-İrlanda kökenli kişilerin oluşturduğu ülkeler olan ve subtropikal kuşakta bulunan Avustralya ve Yeni Zelanda'nın, neden melanom sıklığı yönünden dünyada birinci sırada olduğunu açıklar (32, 33).

Bununla birlikte, melanom gelişiminde güneş ışığı kadar güneş ışığına ne şekilde maruz kalındığı da önemlidir: sürekli olmaktan çok aralıklı, ancak yoğun güneş ışığı maruziyetinin melanom riski yarattığı iddia edilmiştir(34).

2.1.4. Klinik

Melanom, güneş ışığına aralıklı olarak maruz kalan vücut bölgelerinde (erkeklerde sırt ve kadınlarda bacaklar) daha sık görülmektedir. Güneş ışığı ile sürekli olarak karşılaşan yüz ve elde ise daha nadirdir. Oysaki derinin daha sık görülen kanserleri olan skuamoz hücreli ve bazal

hücreli karsinom en çok bu bölgelerden gelişmektedir. Melanomun özellikle kapalı ortamlarda çalışan, güneş ışığı ile karşılaşma olanakları hafta sonları ve tatillerle kısıtlı kişilerde görüldüğü bildirilmiştir (35, 36, 37). Deri, lenf ganglionları, akciğer, karaciğer, beyin, kemik ve ince barsak en çok metastaz yaptığı organlardır (1) .

Melanom, klinik olarak 4 gruba ayrılmaktadır:

- (i) Süperfisyel yayılım gösteren melanom: En sık görülen tiptir. Displastik nevüslerden gelişebilir
- (ii) Nodüler melanom: Hızlı büyüme eğiliminde olup çoğu kez ülserli ve polipoid yüzeyleri vardır.
- (iii) Akral lentiginöz melanom: Koyu renk ciltli kişilerde görülen tek melanom şeklidir. Adından da anlaşılacağı üzere el ayakları, ayak tabanları ve subungual yerleşimli olurlar.
- (iv) Lentigo maligna melanoma: Baş ve boyun gibi güneş ışığı ile temas eden deri bölgelerinde maküler bir lezyon olarak görülürler. İleri yaşlarda daha sıklıkla görülür (38).

2.1.5. Tanı ve Evreleme

Klinik tanının biyopsi ile doğrulanması şarttır. Bundan sonraki aşama patolojik klasifikasyondur: Breslow klasifikasyonu, primer lezyonun patolojik kesitte ölçülen derinliği esasına dayanır; burada epidermisin granüler hücre tabakası ile tümör invazyonunun en çok derinlik gösterdiği nokta arasındaki mesafe ölçülmektedir (39). Clark klasifikasyonu ise invazyonun anatomik yaygınlığını (intraepidermal aşamadan ciltaltı yağ dokusunun invazyonuna kadar değişen derecelerde) esas almaktadır (1).

Hastalığın evresinin belirlenmesi için çeşitli görüntüleme yöntemleri (röntgen, ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans) ve sintigrafiden faydalanılmaktadır. Bölgesel lenf ganglionlarının durumu özellikle önemlidir. Son yıllarda gereksiz cerrahi girişimlerden kaçınabilmek amacı ile “nöbetçi” (sentinel) lenf ganglionunun saptanmasına yönelik lenfosintigrafi yöntemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla, tümör içine ya da çevresine verilen bir radyoaktif madde yardımıyla primer melanom bölgesinin direne olduğu ilk lenf ganglionu tesbit edilmekte ve çıkartılmaktadır. Teröpatik bölgesel lenfadenektomi ancak bu “nöbetçi”

ganglionda metastaz saptanması halinde uygulanmaktadır. Patolojik olarak saptanamayan mikrometastazları gösterebilmek için ise, “nöbetçi” lenf ganglionunun, melanin sentezinde rol alan tirozinaz enzimi haberci RNA’sının varlığı açısından ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile incelenebileceği bildirilmiştir (40).

Klinik ve laboratuvar incelemeler sonucunda hastalık dört evreye ayrılmaktadır (38):

- I. Klinik olarak saptanabilir metastaz yoktur.
- II. Metastaz(lar) mevcut ama primer tümörden en çok 3 cm. uzaklıktadır (satellitli primer tümör).
- III. Bölgesel metastaz:
 - IIIa. Üç santimetreden daha uzak metastazlar.
 - IIIb. Lenf ganglionu metastazı.
 - IIIab. “IIIa” ve “IIIb” birliktedir.
- IV. Uzak metastaz.

2.1.6. Prognoz

Nüksü ve prognozu belirleyen en önemli gösterge tümörün milimetre olarak ölçülen kalınlığıdır (Breslow kalınlığı)(38). Kalınlık arttıkça hem prezentasyon hem de takip sırasında lenfatik ve uzak metastazların görülme sıklığı artmaktadır. Bunun yanı sıra primer tümörde ülserasyon, metastatik ganglionların sayısı ve okült ya da klinik olarak belirgin olmaları gibi faktörlerin de prognoz üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (41). Başka bir çalışmada ise ilerleyen yaş ve artan Clark düzeyi ile birlikte sürvinin de azaldığı saptanmıştır. Diğer yandan primer tümörün ekstremitelerde bulunması, inflamasyon varlığı ve kadın cinsiyet ise iyi prognostik gösterge olarak ortaya çıkmıştır (42).

2.1.7. Tedavi

Primer lezyonun ve metastazların varlığı halinde bölgesel lenf ganglionlarının cerrahi olarak çıkartılması gerekir. Metastaz riski yüksek olan hastalarda ise mikrometastazların ortadan kaldırılması için ajuvan tedavi yöntemlerinden yararlanılmaktadır: kemoterapi, interferon- α ve radyoterapi gibi. Uzak metastaz kötü prognostik göstergedir; palyatif amaçlı cerrahi girişim söz konusu olabilir. Yaygın hastalık durumunda kemoterapi tercih edilmektedir, %20 oranında cevap

alınabilir (43). İmmünoterapi henüz deneyseldir; bu tedavide hastadan alınan lenfositler interlökin 2 (IL-2) ile muamele edilerek lenfokinle aktive olmuş katil hücreler (lymphokine-activated killer cells) elde edilmekte ve daha sonra IL-2 uygulaması ile beraber hastaya geri verilmektedir (44).

2.2. MALİGN MELANOM GENETİĞİ: P16, P14^{ARF} VE CDK4 GENLERİ

Bir çok tümörde olduğu gibi, melanom gelişiminde rol oynayan genetik değişikliklerin araştırılmasında da 2 ayrı yaklaşım söz konusudur: ailevi ve sporadik olguların incelenmesi.

Norris'in 1820 yılında ilk ailevi olguyu tarif etmesinden sonra melanomun kalıtsal yönü uzun süreler ihmal edilmiştir. Ancak 1978 yılında, Lynch ve Clark birbirlerinden ayrı olarak multipl atipik nevüsler ve melanom yatkınlığı ile karakterize aileler bildirmişlerdir (45, 46). Daha sonra dünyanın bir çok yerinde benzer ailelerin belirlenmesi ile FAMMS (Familial Multiple Mole Melanom Syndrome; Ailevi Multipl Nevüs Melanom Sendromu) tanımlanmıştır (47). 1992 yılında bağlantı analizi ile sendromdan sorumlu gen 9p13-p22 bölgesine lokalize edilmiştir (3).

Diğer yandan, bu tarihten daha önce yapılan sitogenetik incelemeler, sporadik melanom olgularında da 9. kromozomun kısa kolunun, özellikle de 9pter-p22 bölgesinin kayıp olduğunu göstermiştir (4, 48). Minimal kayıp bölgesinin daha da daraltılması ancak moleküler çalışmalarla mümkün olabilmiş ve 1992 yılında 9p21 bölgesini kapsayan 2-3 megabazlık bir bölgede heterozigozite kaybı (Loss of heterozygosity; LOH) saptanmıştır (49). Bu bulgu melanom ailelerinde yapılan bağlantı analizi çalışmaları ile uyumlu idi ve adı geçen bölgede hem ailevi hem de sporadik melanom gelişiminden sorumlu gen(ler)in olduğunu düşündürüyordu. Çok geçmeden FAMMS ailelerinde bu lokusta bulunan p16 (diğer adı ile CDKN2A) geninde "germline" mutasyonlar bulunduğu gösterilmiştir (50).

2.2.1. P16 Tümör Süpresör Geni

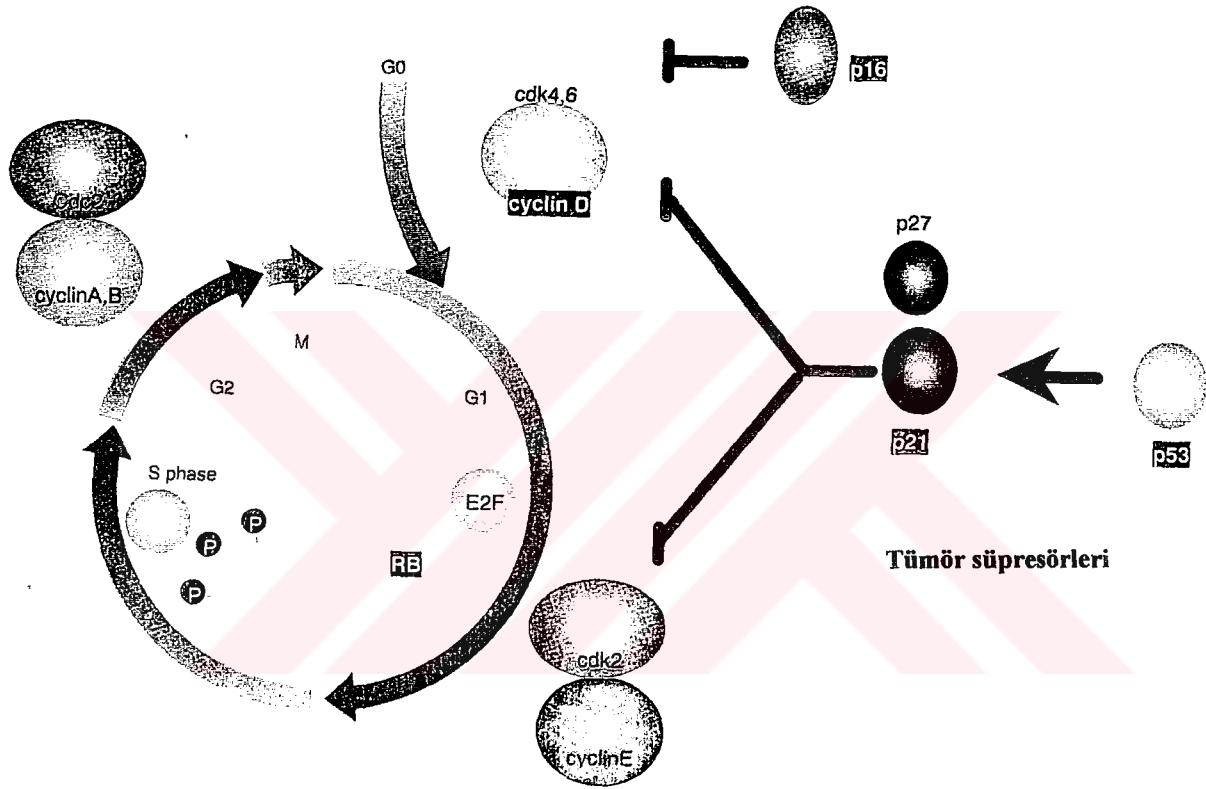
P16 geninin kodladığı protein 156 aminoasit uzunluğundadır ve protein-protein etkileşiminde rol oynayan 4 ankirin benzeri tekrar bölgesi içermektedir (diğer adları: p16^{INK4A}, CDKN2A, MTS1). P16, INK4 (*inhibitor of the cyclin-dependent kinase 4*) gen ailesinin bir

üyesidir. INK4 ailesinin özelliği hücre siklusunun sürdürülmesini sağlayan siklin bağımlı kinazları (*cyclin dependent kinase; CDK*) inhibe etmeleridir; p16, CDK4 ve CDK6 siklin bağımlı kinazları ile ankirin tekrar bölgesi aracılığıyla etkileşmektedir. CDK4/6 aktif halde iken retinoblastoma tümör süpresör proteinini (Rb) fosforillemektedirler. Fosforillenmiş Rb, hücre siklusunun G1 fazından S fazına geçişi durdurma özelliğini yitirmekte ve siklus S fazına ilerleyerek hücre bölünmesi gerçekleşmektedir (Şekil 1). Dolayısı ile p16, CDK4/6 proteinlerine bağlanarak onları inhibe etmekte ve bir anlamda hücre çoğalmasını frenlemektedir (5).

P16 geni sporadik ve ailevi melanomlarda farklı şekilde etkilenmektedir: sporadik melanomlarda tümör dokusunda, 9p21 bölgesinde p16 genini içine alan homozigot delesyonlar sıkken, p16 nokta mutasyonları nadirdir (51, 52, 53). Buna karşılık ailevi olgulardaki p16 germline mutasyonları nokta mutasyonu tipindedir (54, 55). Tümör dokusunda 9p21 bölgesinde LOH görülebilse bile homozigot delesyonlar nadirdir (56). Ayrıca germline p16 mutasyonları ailevi olguların yalnızca %20'sinde saptanabilmektedir (47).

P16 geninin melanomla ilişkisi üzerinde yoğun olarak durulduğu bir sırada bu genin değişik tümör hücre kültürlerinde delesyona uğradığının gösterilmesi, dikkatlerin daha da yoğun olarak p16 üzerinde toplanmasına yol açmıştır (57, 58). Daha sonraki değişik çalışmalarda p16'nin çok çeşitli tümör hücre kültürlerinde (melanoma, özefagus, akciğer, mezotelyoma, meme, akut lökoz) %85'e varan oranlarda delesyona uğradığı anlaşılmıştır (59). Bunu takiben, kültüre edilmemiş tümör hücrelerinde de sıklıkla kayba uğradığı saptanmıştır (Tablo 1)(5). P16'nin etkilendiği tümör spektrumunun bu kadar geniş olması, bazı yayınlarda MTS1 (*multiple tümör suppressor*) olarak adlandırılmasına yol açmıştır (60, 61). P16'nin tümör dokusunda biallelik olarak inaktivasyona uğraması, germline mutasyonlarının melanom yatkınlığı oluşturması, onun gerçek (*bona fide*) bir tümör süpresör geni olduğunu göstermektedir.

Çoğu kez nokta mutasyonları ile inaktive olan diğer tümör süpresörlerinin tersine, p16 geninde daha çok homozigot delesyonlar görülmektedir (5). Bununla birlikte nokta mutasyonları da zaman zaman saptanabilmektedir. Diğer yandan, genlerin 5' tarafında bulunan CG dinukleotitlerinin ya da CpG adalarının metillenmesi o genin transkripsiyonunu engelleyebilmektedir. Bu mekanizmanın renal hücre karsinomu (Von Hippel Lindau geni



Şekil 1: Hücre siklusu. Hücre siklusunun ilerlemesi siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerinin aktivitesi ile mümkündür. G1 fazından S evresine geçiş, retinoblastoma proteininin kontrolü altındadır; retinoblastoma, E2F transkripsiyon proteinlerini bağlayarak siklusun devamı için gerekli genlerin transkripsiyonunu engellemektedir. CDK4,6/siklin D kompleksi, retinoblastoma proteinini fosforilleyerek E2F'in serbest kalmasını sağlar ve siklus S evresine girer. CDK4,6/siklin D kompleksi, p16 tümör süpresörünün negatif kontrolü altındadır; p53 tümör süpresörü de de p21 aracılığı ile CDK4, 6/siklin D ve CDK2/siklin E komplekslerini baskılayarak hücre siklusunu duraklatmaktadır (Genes VI. Lewis B. Oxford University Press, Oxford 1997. Sayfa:1162).

metilasyonu) ve retinoblastoma (Rb geni metilasyonu) patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (62, 63). P16 geninin de bir çok kanser türünde (baş-boyun, akciğer, beyin, kolon) 5' CpG adaları metillenmekte ve transkripsiyonu baskılanmaktadır (5). Metilasyon, p16 inaktivasyonunda çok önemli bir mekanizma olarak görünmektedir; bununla birlikte melanomda nadirdir (64).

Tablo 1. P16 geninin çeşitli sporadik tümörlerdeki etkilenme şekli ve sıklıkları. HD: Homozigot delesyon (5).

Tümör tipi	HD (%)	Mutasyon(%)	Metilasyon(%)	Toplam
Melanom	14	7	5	26
Meme	7	4	20	31
Kolon	0	Bilinmiyor	27	27
Prostat	4	3	7	14
Pankreas	30	32	13	75
Mide	4	1	39	44
Mesane	32	4	23	59
Mezotelyoma	56	0	Bilinmiyor	59

Ailevi melanomların bir kısmında ise p16 germline nokta mutasyonları saptanmaktadır. Bu mutasyonlar, proteinin CDK4 ile bağlanmasını sağlayan ankirin tekrar bölgesini etkilemektedir (65). Bu ailelerde pankreas kanseri de görülebilmektedir ve p16 germline mutasyonlarının pankreas kanseri riskini 13 kat arttırdığı bildirilmiştir (66). Diğer yandan p16 ile ilişkisiz ailevi melanomlarda pankreas kanseri görülmemektedir (5). Bazı ailevi melanom olgularında seyrek olarak rastlanan CDK4 germline mutasyonları ise, ilginç olarak, CDK4'un p16 ile etkileşim bölgesindedir (21).

Melanom ailelerinin %50'sinde 9p21 ile bağlantı saptanabilmektedir, ayrıca bunların ancak %20'sinde p16 mutasyonları gösterilebilmektedir. CDK4 mutasyonları çok nadirdir (6, 67, 68). Geriye kalan olgularda 9p21'de bulunan başka tümör süpresör genlerinin ya da p16 promotor mutasyonlarının sorumlu olabileceği iddia edilmiştir(69).

Bir başka INK4 üyesi olan p15, p16 ile aynı lokusta (9p21) bulunmaktadır ve tümörlerde sıklıkla ikisi birlikte delesyona uğramaktadırlar. Ancak, spesifik olarak p15'in kayba uğradığı tümörler henüz gösterilememiştir ve p16 ile beraber kayba uğramasının daha çok rastlantısal olduğu –şimdilik – iddia edilmiştir (5, 70).

2.2.2. $P14^{ARF}$: Muhtemel Bir Tümör Süpresörü

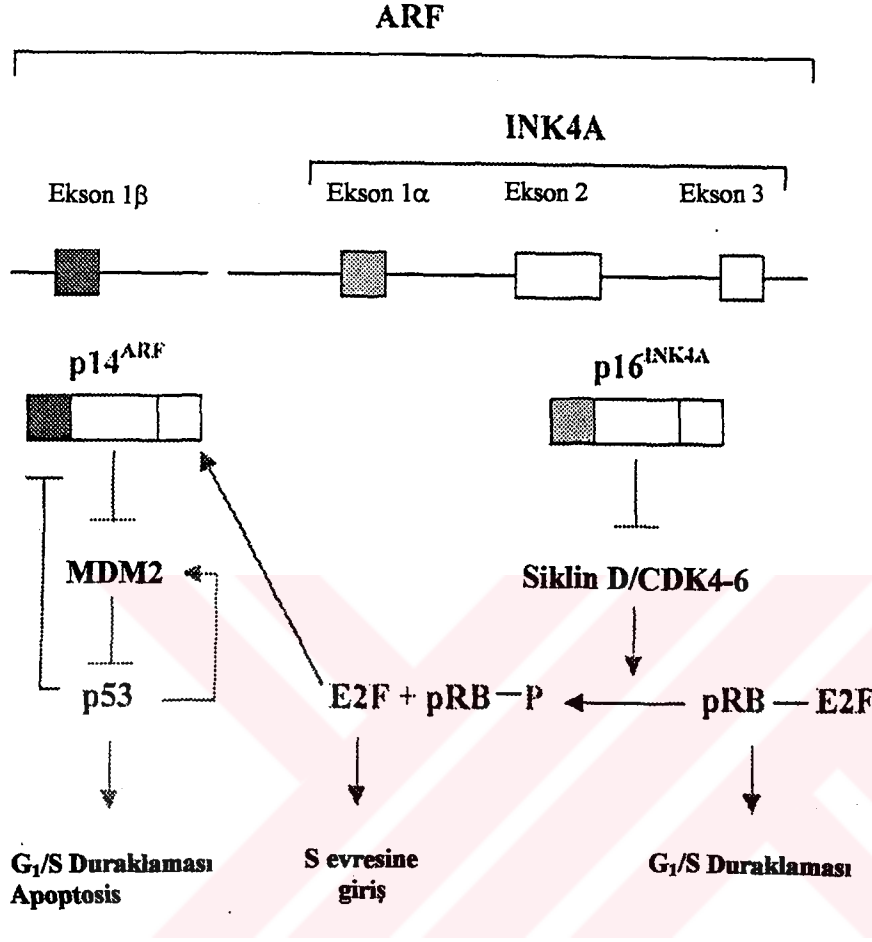
$P16$ ile ilgili çalışmaların yoğun olarak devam ettiği bir sırada beklenmedik bir gelişme olmuş ve $p16$ ile aynı lokusta, onunla örtüşen, ancak promoter'i farklı olan ikinci bir gen keşfedilmiştir (71). $P14^{ARF}$ olarak adlandırılan bu yeni genle $p16$ 'nın 1. eksonları farklı, 2. ve 3. eksonları ise ortaktır. DNA düzeyindeki bu ortaklığa rağmen, $P14^{ARF}$ haberci RNA'sının translasyonu farklı bir okuma çerçevesi (Alternative Reading Frame) ile yapıldığından, sentezlenen protein $p16$ ile hiçbir benzerlik göstermemektedir (Şekil 2) (56). $P14^{ARF}$, tümörlerde hemen daima $p16$ ile birlikte homozigot delesyona uğramaktadır (72).

$P14^{ARF}$, 132 aminoasitten oluşan bazik bir proteindir; bilinen proteinlerin hiçbirisi ile benzerlik göstermemektedir (faredeki homologu $p19^{ARF}$ olarak adlandırılmaktadır). Siklin bağımlı kinazlarla etkileşmeden hücre siklusunu durdurabildiği gösterilmiştir (73). Bu etkisinin $p53$ tümör süpresörü aracılığı ile gerçekleştiğine dair kanıtlar vardır: $P14^{ARF}$, MDM2 adlı bir proteine bağlanmaktadır. MDM2, normal şartlarda, $p53$ ile etkileşerek onun yıkımını sağlamaktadır, $P14^{ARF}$ ile bağlanması ise $p53$ degradasyonunu engellemektedir. Sonuç, $p53$ 'ün tetiklediği apoptosis ya da hücre siklusu duraklamasıdır (74).

İşlevsel özellikleri muhtemelen 1β eksonu tarafından kodlanan bölüm tarafından sağlanmaktadır; bu bölümün kaybı halinde hücre siklusu durdurulamamaktadır. Bunun aksine, örneğin 2. ekson mutasyonları in vitro olarak $p16$ 'yi inaktive ederken, $P14^{ARF}$, yi etkilememektedir (75).

Çeşitli mutajenik uyarılar $P14^{ARF}$, yi aktive etmektedir: fare embriyosu fibroblastlarında, retrovirus transfeksiyonu ile eksprese ettirilen *ras* onkogeni, $P14^{ARF}$ ekspresyonunu uyarmaktadır ve $p53$ stabilize olmaktadır (76). Bu da $P14^{ARF}$, nin uygunsuz proliferatif uyarıların engellenmesinde rol oynadığını düşündürmektedir. *E1A* ve *myc* onkogenlerinin fare embriyosu fibroblastlarındaki ekspresyonu da benzer etki göstermektedir (77, 78). Buna karşılık, $P14^{ARF}$, DNA hasarına karşı gelişen $p53$ yanıtında rol almamaktadır (79).

Bütün bu gözlemler, $p14^{ARF}$, nin de bir tümör süpresörü olabileceğini düşündürmektedir. Ancak gerek tümör hücresi kültürlerinde, gerekse primer tümör hücrelerinde hemen daima $p16$



Şekil 2. Kromozom 9p21'deki INK4a/ARF lokusunun genomik organizasyonu. Bu lokusta iki ayrı ürün kodlanmaktadır: p16^{INK4a} ve p19^{ARF}. p16^{INK4a}'nın 1. eksonu 1α, p19^{ARF}'nin 1. Eksonu ise 1β olarak belirtilmektedir. İki ve üçüncü eksonlar her iki gende de ortaktır, ancak okuma çerçeveleri farklı olduğu için p16^{INK4a} ve p19^{ARF}'nin aminoasit dizileri benzeşmez. P14^{ARF}, mdm2'yi, p16^{INK4a} da siklin D/CDK4-6 kompleksini baskılamaktadır (Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. Exp Cell Res, 264:42-55, 2001).

ile beraber delesyona uğraması değerlendirmeyi zorlaştırmaktadır. Bu konuya açıklık getirmek için p16/19^{ARF} lokusunun hedef alındığı çeşitli “knock-out” fare deneyleri yapılmıştır. İki gende ortak olan 2-3. eksonlarda delesyon oluşturulmuş farelerde (INK4a^{Δ2/3} fareler) sarkom ve lenfoma gelişmektedir (80). Ancak bu mutasyonda p14^{ARF},nin esas fonksiyonel bölümü olan 1β eksonu sağlam olduğu için fenotipe olan katkısı açık değildir ve gözlenen tümör eğiliminin yalnızca p16 kaybından kaynaklanması mümkündür. Tümörlerde ve hücre kültürlerinde de spesifik olarak p14^{ARF},yi etkileyen nokta mutasyonları nadirdir (72). Bazı T hücre akut lenfositik lökoz olgularında 1β eksonunun etkilendiği bildirilmiştir (81). Bugüne değin hiçbir ailevi kanser sendromunda selektif olarak p14^{ARF},yi etkileyen germline mutasyonunun görülmeşi de onun bir tümör süpresörü olarak öneminin sorgulanmasına yol açmıştır (1). Oysaki p16 geninin p14^{ARF},yi etkilemeyen 1α germline mutasyonlarının FAMMM sendromuna yol açtığı bilinmektedir (82). Bununla birlikte, p14^{ARF},nin selektif olarak inaktive edildiği farelerde de, p16 ekspresyonunun normal olmasına rağmen INK4a^{Δ2/3} farelerdekine benzer bir tümör fenotipi saptanmaktadır. Bu da p14^{ARF},nin tümör patogeneziine özgün katkısının olduğunu düşündürmektedir (1).

P16 retinoblastoma üzerinden, p14^{ARF} de p53 tümör süpresörü üzerinden etki göstermektedir. Her iki tümör süpresörü da hücre siklusunun kontrolunda son derece önemli rol oynamaktadır. Dolayısı ile ikisinin birlikte inaktive olması bir tümör hücresine büyük bir seçim üstünlüğü sağlayacaktır. Bir çok tümörde ve melanomda p16/p14^{ARF} lokusunun homozigot delesyonu muhtemelen bu tür bir “2 yönlü” üstünlük sağlamaktadır (5).

2.2.3. CDK4 Onkogeni

Hücre siklusunun sürdülmesinde oynadıkları itici güç siklin bağımlı kinazları ve dolayısı ile CDK4’ü kanser gelişiminde rol oynaması muhtemel onkogenler arasına sokmaktadır. Gerçekten de, yukarıda sözü edildiği gibi, bazı ailevi melanomlarda CDK4 germline mutasyonları p16 inhibisyonunun ortadan kalkması ve CDK4 proteininin konstitüsyonel aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır; yani CDK4 onkogenik özellik kazanmaktadır. Yalnız nokta mutasyonları değil, gen amplifikasyonu da aynı etkiyi gösterebilir: glioma, Ewing sarkomu, osteosarkom ve meme kanserlerinde CDK4 geninde amplifikasyon saptanmıştır (83, 84, 85, 86). Bu gözlemler, sporadik malign melanomda da CDK4 gen aşırı ekspresyonunun ya da gen

amplifikasyonunun rol oynayabileceğini akla getirmektedir. Immunohistokimyasal çalışmalar melanomda CDK4 geninin aşırı eksprese olduğunu göstermiştir (87). Gen düzeyinde yapılan az sayıda çalışmada ise gerek melanom hücre soylarında, gerekse tümör dokusunda CDK4 amplifikasyonunun sık olmadığı görülmüştür. Bir araştırmada, 65 tümör ve 5 hücre dizisinin yalnızca birinde amplifikasyon saptanmıştır (22). Aynı çalışmada CDK4 mRNA düzeylerinin tümörlerin %76'sında yüksek olduğu bulunmuştur. Walker tarafından yürütülen bir başka çalışmada ise 45 melanom hücre soyunun beşinde amplifikasyon gösterilebilmiştir (88). Bu gözlemler, CDK4 aşırı ekspresyonunun melanom patogenezinde rol oynadığını, ancak bu aşırı ekspresyona gen amplifikasyonunun katkısının önemli olmadığını düşündürmektedir. CDK4 düzeylerini arttıran bir başka onkogen olan siklin D1 aşırı ekspresyonu uveal melanom gibi bazı tümörlerde bu etkiden sorumlu olabilir (89).

2.2.4. Malign Melanomda Görülen Diğer Kromozomal Aberasyonlar

1p: İleri evrelerde 1. kromozomun kısa kolunda translokasyon, delesyon ve LOH görülebilmektedir. Burada metastazı engelleyen tümör süpresör genleri olduğu ileri sürülmüştür (1).

Kromozom 6q22-27: Özellikle ileri evrelerde bu bölgede delesyon görülmektedir. Bu delesyonun tümör oluşumunda mı yoksa tümörün metastatik özellik kazanmasında mı rol oynadığı kesinlikle anlaşılamamıştır (1).

7. Kromozom: Amplifikasyonları görülmektedir. Bir reseptör tirozin kinaz olan epidermal büyüme faktörü reseptör geni 7p12.3-p12.1 lokusunda bulunmaktadır ve 7. kromozom amplifikasyonu ile beraber ekspresyonu artmaktadır. Reseptör tirozin kinazların çeşitli kanser türlerinin patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (90).

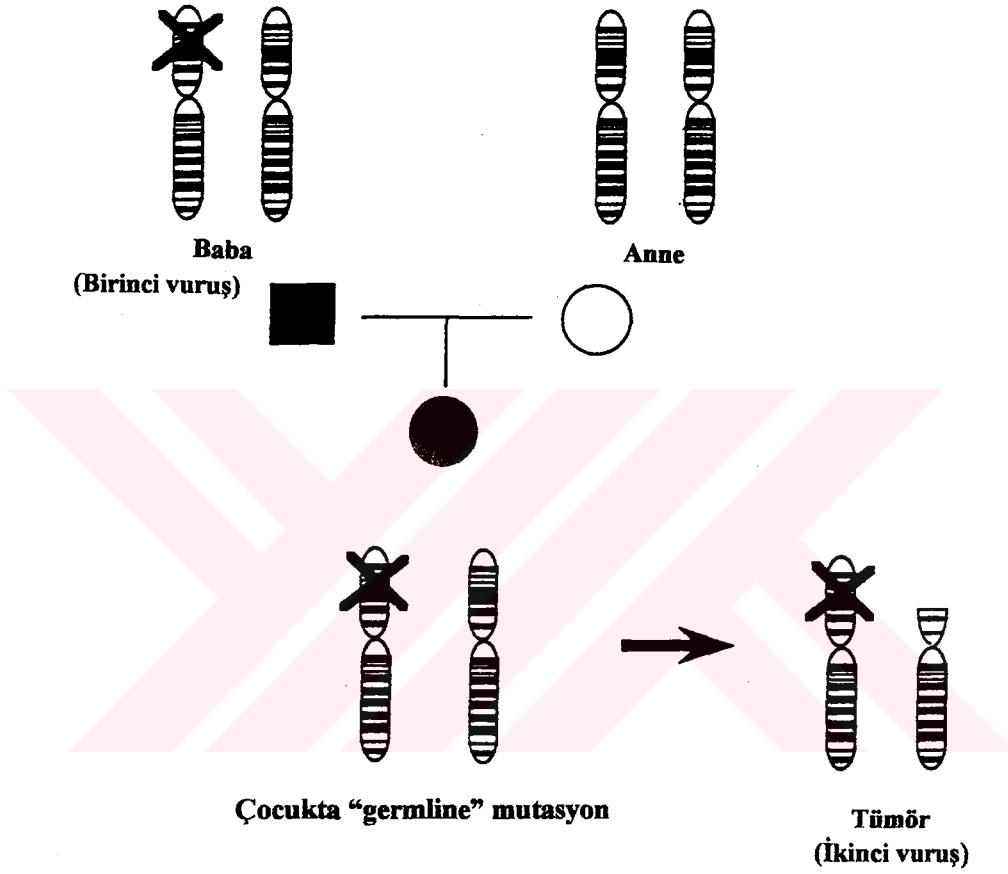
10. kromozom: Sıklıkla delesyona uğramakta ya da kromozom 10q24-26 bölgesinde LOH saptanmaktadır. Bu bölgede bir tümör süpresör geni olan PTEN ("*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*") bulunmaktadır ve çeşitli tümörlerde delesyona uğramaktadır (91). PTEN genindeki germline mutasyonların Cowden sendromuna da yol açtığı bilinmektedir. Bu sendrom, çeşitli dismorfik bulgular (makrosefali, "birdlike" yüz görünümü, hipoplastik maksilla ve mandibula) deri, mukoza ve tiroid hamartomları, çeşitli karsinomlar

(tiroid, meme, over ve serviks) ile karakterize, otozomal dominant geçişli bir herediter kanser sendromudur (92). Cowden sendromunda malign melanom nadirdir (93). Bununla birlikte, sporadik melanomlarda allelik delesyon ve mutasyonlarının gösterilmiş olması PTEN'in melanom patogenezinde önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir (1).

2.3. RETİNOBLASTOMA VE RETİNOBLASTOMA TÜMÖR SÜPRESÖR GEN

Retinoblastoma, çocukluk çağında görülen en sık göziçi tümörüdür. Sıklığı 1/3500-25000 arasında değişmektedir. Olguların çoğu sporadik olmakla birlikte (%60), kalıtım paterninin otozomal dominant olduğu ailevi formu da (%40) mevcuttur. Bu %40 olgunun %15'inde tümör tek taraflı, %25'inde de çift taraflı olarak görülmektedir (14). Ailevi olguların bir başka özelliği, sporadik vakalara göre daha erken yaşta ortaya çıkmalarıdır. Bu epidemiyolojik verilere dayanarak, Knudson 1971 yılında "iki vuruş" hipotezini ortaya atmıştır: buna göre, bir hücrede tümöral gelişimin başlaması için, iki kritik mutasyonel "olayın" gerçekleşmesi gerekmektedir; ailevi olgularda bu mutasyonlardan birincisi germ hücresi aracılığıyla ebeveynden kalıtılmakta (*germline mutasyon*) ve doğumdan itibaren tüm retinal hücreler bu mutasyonu taşımaktadır. Dolayısı ile hepsi onkogenetik sürece girmişlerdir; bu sürecin devam edebilmesi için gereken ikinci kritik mutasyonun bu *birçok* hücrenin herhangi birinde ortaya çıkması olasılığı yüksektir (*somatik mutasyon*). Bu durumun iki sonucu vardır: 1° Bir hücrede iki mutasyonel olayın gelişmesi için gereken süre kısaldığından hastalık daha erken yaşta ortaya çıkar; 2° Birden fazla sayıda retinal hücrede ikinci bir mutasyonun gelişmesi olasılığı daha yüksektir, yani hastalık çift taraflı ya da çok odaklıdır. Sporadik olgularda ise, iki mutasyonel olayın arka arkaya aynı hücrede *de novo* olarak ortaya çıkması olasılığı daha düşük ve zamana bağlı olduğundan, hastalık tek odaklı ve geç başlangıçlıdır (Şekil 3) (94).

Bazı retinoblastoma olgularında 13q14 bölgesinde sitogenetik olarak belirlenebilen konstitüsyonel delesyonlar saptanmıştır (95). Sitogenetik bulgu saptanmayan ailevi olgularda ise bağlantı analizi sorumlu genin aynı bölgede olduğunu göstermiştir (96). Genin klonlanması 1986 yılında mümkün olmuştur (97). O tarihten sonra yapılan çalışmalar, germline mutasyonların sitogenetik olarak belirlenebilen delesyonlardan ibaret olmadığını, submikroskopik delesyonlar, insersiyon ve nokta mutasyonlarının da söz konusu olabileceğini göstermiştir. Bu mutasyonlar çerçeve kaymasına (*frameshift*) ve normalden daha kısa bir proteinin sentezlenmesine (*protein truncation*) neden olmaktadır (13).



Şekil 3. Knudson'un "iki vuruş" hipotezinin şematik gösterimi. Babadaki germline retinoblastoma mutasyonu çocuğa kalıtılmıştır (birinci vuruş); ancak çocukta tümör gelişimi ancak genin ikinci kopyasının kaybıyla (ikinci vuruş) mümkün olacaktır (The Genetic Basis of Human Cancer. Vogelstein B, Kinzler KW [editörler]. The Genetic Basis of Cancer. Birinci baskı, New York: McGraw-Hill [1998], sayfa :411).

Knudson'ın hipotezine göre yorumlanacak olursa, ailevi retinoblastomalarda, "birinci vuruş", retinoblastoma geninin iki kopyasından birinin (maternal ya da paternal) *germline* mutasyonuna karşılık gelmektedir. Ancak, hastalığın ortaya çıkabilmesi için bu yeterli değildir ve ikinci bir mutasyonel olayın gelişmesi şarttır ("ikinci vuruş"). Ailevi olgularda, normal dokuda 13q14 bölgesinde heterozigozite korunurken tümörde LOH saptanmıştır, dolayısı ile, ikinci vuruş yine retinoblastoma geninin -bu kez- ebeveynlerden sağlam olarak kalıtılan kopyasını etkilemektedir (98). Kalıtsal bir hastalık olarak retinoblastoma otozomal dominant patern göstermekle birlikte, mutasyonun hücre düzeyindeki etkisi resesiftir (14). İkinci (somatik) mutasyonun ortaya çıkışından, non-disjunction, mitotik rekombinasyon, gen konversiyonu, delesyon ve nokta mutasyonu gibi mekanizmalar sorumlu tutulmuştur (99).

Retinoblastoma proteininin fonksiyonu:

Retinoblastoma proteini, 27 eksonu bulunan ve 180 kb'lık bir genomik DNA üzerine yayılmış olan Rb geni tarafından kodlanmaktadır. Genin haberci RNA'sı bir çok dokuda yaygın olarak bulunmaktadır. Protein 928 aminoasit uzunluğunda ve 110 kDa (kilodalton) ağırlığındadır. Büyük çoğunluğu hücre çekirdeğinde bulunmaktadır. Hücre siklusunu düzenleme özelliği olan bu proteinin fonksiyonu, fosforilasyon/defosforilasyon mekanizması ile ayarlanmaktadır; G0/G1 evresinde nerdeyse tamamı fosforillenmemişken, S ve G2 evresinde büyük ölçüde fosforillenmiş durumdadır Fosforillenmemiş Rb, siklusun S fazına giriş ve DNA sentezi için gerekli olan E2F transkripsiyon faktörlerini baskılamakta, dolayısı ile siklusu durdurmaktadır. Siklusun devamı ve hücre çoğalması için, Rb proteininin bu etkisinin aşılması gerekmektedir. Hücre çoğalmasının gerekli olduğu durumlarda, geç G1 fazında, hücre içi düzeyi artan siklin bağımlı kinazlar (cdk4 ve cdk6) Rb proteinini fosforilleyerek S fazına girişi sağlamaktadırlar. Anlaşılaçağı üzere, Rb, hücre siklusunu G1 evresinde kontrol etmektedir; bu etkinin ortadan kalkması tümör oluşumu ile sonuçlanabilir (100).

Bir çok tümörde retinoblastoma fonksiyonu.. kaybolmaktadır: immünohistokimyasal boyama yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalarda; meme, kolon, endometrium kanserinde ve non-Hodgkin lenfomada Rb ekspresyonunun azaldığı yazılmıştır (101, 102, 103, 104). Çocukluk çağı lösemileri ve nöroblastomasında SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) analizi Rb

geninin mutasyona uğradığını ve bu durumun prognostik önemi olduğunu göstermiştir (15). Benzer şekilde, kronik lenfositik lösemi, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri, hepatosellüler karsinom retinoblastoma geninde gen içi düzenlenme, mutasyon, heterozigozite kaybı saptanmaktadır (16, 17, 18, 19). Protein ekspresyonu ve DNA düzeyinde yapılan bu çalışmalar, retinoblastoma geninin tümör kontrolundaki rolünü doğrulamaktadır.

Retinoblastoma geninin inaktive olduğu tümör spektrumunun bu denli geniş olması melanom patogenezinde de rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ailevi retinoblastoma olgularında melanom sıklığı da yüksektir (14). Uveal melanomlarda retinoblastoma gen ekspresyonu azaldığı gibi, retinoblastoma lokusunda da LOH saptanmaktadır (105). Deri melanomlarında yapılan araştırmaların sayısı ise çok kısıtlı olup bir çalışmada retinoblastoma gen mutasyonunun nadir olduğu bildirilmiştir (20).

2.4. P53 TÜMÖR SÜPRESÖR GENİ

1979 yılında, simian virüs (SV40) ile transforme edilmiş hücrelerde yapılan araştırmalar sırasında virüsün “büyük T antijeni” ile birlikte çöken 54 kDa ağırlığında bir protein keşfedilmiştir. Sonradan p53 olarak adlandırılan bu proteinin, transfeksiyon deneylerinde hücreleri transforme edebilmesi önceleri onun bir onkoprotein sanılmasına yol açmıştır. Daha sonraki çalışmalarda, proteinin yalnızca mutant şeklinin bu özelliği gösterdiği, normal şeklinin ise tersine transformasyonu baskıladığı anlaşılmıştır. Kanser dokusunda p53 mutasyonları ilk kez 1989 yılında kolon tümörlerinde saptanmıştır. Bu tümörlerde, kromozom 17p13'deki allelik delesyon ve nokta mutasyonlarının Knudson'ın iki vuruş modeli ile uyumlu olması ve in vitro deneylerde proteinin normal şeklinin hücre transformasyonunu baskılaması, araştırmacıları p53'ün esas olarak büyümeyi baskılayıcı, yani tümör süpresör aktiviteye sahip olduğu kanısına yöneltmiştir. Gerçekten de sonraki bir çok çalışma p53'ün insan tümörlerinin en az yarısında mutasyona uğradığını ortaya koymuştur (7, 106).

2.4.1. Yapı ve fonksiyon

P53 geni kromozom 17p13 bölgesindedir ve 11 eksonu vardır. Transkripti (mRNA) 2.8 kb uzunluğundadır. Kodladığı protein 393 aminoasitten oluşur ve 53 kDa ağırlığındadır. Hücre içinde bir tetramer formunda bulunmaktadır (106).

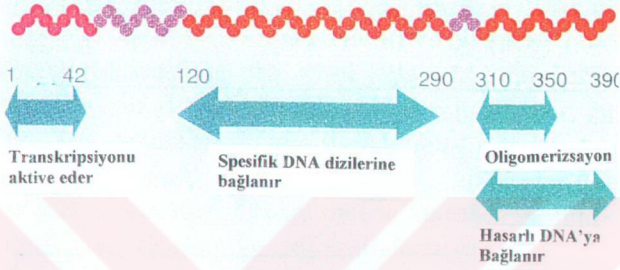
p53 bir transkripsiyon faktörüdür; p21, MDM2, GADD45, siklin G, Bax gibi bir çok hedef genin transkripsiyonel aktivasyonunda ya da baskılanmasında rol almaktadır. Üç fonksiyonel “bölge” (domain) mevcuttur: transkripsiyon düzenleyici “bölge” proteinin amino ucundadır, karboksil ucundaki “bölge” de proteinin kendi kendisi ile tetramerler oluşturmasını sağlamaktadır. Orta bölge (“core”) spesifik DNA motiflerine bağlanabilme özelliği göstermektedir; evrimsel olarak iyi korunmuştur ve 4-8. eksonlar tarafından kodlanmaktadır (Şekil 4) (106, 107).

Normal şartlarda p53 hücre içinde inaktif halde, düşük yoğunlukta ve kısa yarı ömürlü olarak bulunmaktadır. Stabilizasyonunun düzenlenmesinde MDM2 adlı bir protein rol oynamaktadır. MDM2, p53’ün amino ucuna bağlanarak hem onun transkripsiyonel etkinliğini baskılamakta, hem de *proteasom* adlı komplekslere yönlendirerek burada degradasyonunu (proteoliz) sağlamaktadır (108). İlginç olarak, p53, MDM2 geninin de transkripsiyonunu aktive etmektedir(109).

Bir çok etki (ya da “stres” faktörleri) p53’ün hücre içi yoğunluğunu arttırarak ve katlanmasında (konformasyonunda) değişiklik yaratarak onu aktive etmektedir. Bu stres faktörleri başlıca iki grupta toplanmaktadır:

I. DNA hasarı:

İyonizan ışınların ve ultraviolenin yol açtığı DNA hasarı bazı kinazları (Chk1 ve Chk2) uyarmakta ve bunlar da p53’ün amino ucunu fosforilleyerek onun MDM2 ile etkileşimini engellemektedir. DNA hasarının tanınmasında ataksi- telenjiektazi hastalığından sorumlu genin kodladığı ATM proteini de rol oynamaktadır. ATM’nin de p53’ü fosforilleyebilme özelliği vardır (110). Bu gözlemler, fosforilasyonun p53 aktivasyonunda önemli bir mekanizma olduğunu göstermektedir (108).



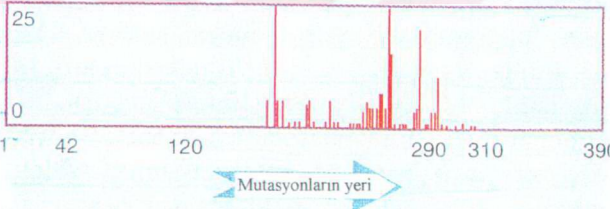
TBP

mdm2

SV40 T antigen

E1B 55 kD

Mutasyonların sayısı



Şekil 4. p53 proteininin değişik "domain"leri farklı işlevlerden sorumludurlar: amino ucu transkripsiyonel aktivite, "core" domain hedef DNA'ya bağlanma, ve karboksil ucu da tetramerizasyon ve hasarlı DNA'ya bağlanabilme özelliği göstermektedir. Tümörlerdeki mutasyonlar proteinin DNA'ya bağlanma özelliği gösteren orta bölümünde yoğunlaşmıştır (Genes VI. Lewis B. Oxford University Press, Oxford 1997. Sayfa:1165).

II. Genotoksisite göstermeyen etkiler:

a) *Hipoksi*. Hipoksik şartlarda p53 aktive olabilmektedir. Tümör gelişimi ve damarlanma (anjioenez) aynı hızda olmadığından, çoğu kez tümörün orta bölgesinde iyi kanlanamayan hipoksik bir bölge ortaya çıkmaktadır. Bu bölgede artan p53 aktivitesinin tümör hücrelerini apoptosise yönlendirdiği gösterilmiştir (107).

b) *Ribonükleotid depleasyonu*. DNA sentezi için ribonükleosit trifosfatlar gerekli olduğundan bunların azalması halinde, p53 aktive olmakta ve hücre siklusu durdurulmaktadır (111).

c) *Viral proteinler*: Adenovirus E1A ve papillomavirus E7 proteinlerinin p53 üzerinden apoptosise başlattığı gösterilmiştir (107). Ebstein-Barr virusu genomu tarafından kodlanan "ZEBRA" proteini de p53'ü aktive edebilmektedir. Bu etkinin onkojenik virusların replikasyonunu kontrol altında tuttuğu iddia edilmiştir (112).

d) *Onkogen aktivitede artış*: Daha önce söz edildiği gibi onkogen aktivitenin uyardığı p14^{ARF}, MDM2'ye bağlanarak onu etkisizleştirmekte ve dolayısı ile p53'ü aktive etmektedir (74).

2.4.2. p53 ve hücre siklusu

DNA hasarının uyardığı p53, p21 (diğer adları: Waf1, Cip-1) adlı bir proteini aktive etmekte, bu da siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerine bağlanarak siklusu G1 evresinde durdurmaktadır (113). P53, DNA tamirini başlatan bir protein olan GADD45'in de transkripsiyonunu uyarmaktadır (114). Bütün bunlar, p53'ün bir yandan p21 aracılığı ile siklusu duraklatırken, diğer yandan da GADD45 aracılığı ile de DNA tamirini sağladığını göstermektedir.

Hücre siklusunun sürdürülmesi ve kontrolunda p16/p14^{ARF}- siklinler-siklin bağımlı kinazlar-retinoblastoma etkileşiminin mekanizmasına daha önce değinilmişti. Tümörlerin tamamına yakınında bu etkileşimi oluşturan unsurlardan birinde hata (siklinlerde aşırı ekspresyon, tümör süpresörlerinde ise mutasyon ya da ekspresyon azalması) ortaya çıkmaktadır (107). Daha önce de ifade edildiği gibi, P16/P14^{ARF} geninin, herhangi bir mekanizma ile inaktivasyona uğraması, P14^{ARF}'nin MDM2 üzerindeki baskısının kalkması ve p53 yıkımının artması ile sonuçlanabilir. Bu da hücre siklusu üzerindeki kontrolün kaybı anlamına gelmektedir (5).

2.4.3. p53 ve apoptosis

Çok hücreli organizmalarda, gelişim, doku homeostazisinin korunması ve onkogenetik sürecin engellenmesi açısından apoptosis (programlı hücre ölümü) büyük önem taşır. Radyasyon, büyüme faktörlerinde azalma, onkogen aktivasyonu ve glukokortikoidler gibi bir çok iç/dış etki apoptosisi uyabilir (115).

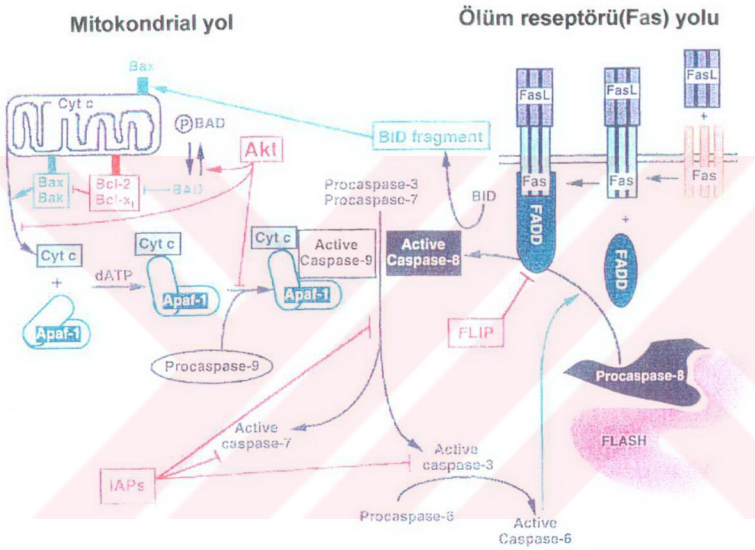
Apoptotik sürecin başlatılmasında başlıca 2 mekanizma söz konusudur; bu sürecin sonunda membran balonlaşması, hücrenin parçalanması gibi apoptozise özgü morfolojik değişiklikleri yaratan moleküller ise kaspaz adlı proteolitik enzimlerdir (Şekil 5):

1. Hücre yüzeyindeki Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü ailesinin bir üyesi olan Fas (CD95) reseptörlerinin uyanması: Fas ligandı ile uyarı, reseptör oligomerizasyonuna neden olmakta ve bu da (FADD adlı molekül aracılığı ile) prokaspaz-8'in aktif kaspaz-8'e dönüşümünü sağlamaktadır. Aktif kaspaz-8 de, aktif kaspaz 6 oluşumu ile sonlanan kaspaz çağlayanını harekete geçirmektedir.

2. Mitokondrial membran aralığından sitokrom-c salınması: Sitokrom C, Apaf-1 adlı proteinle birleşerek prokaspaz-9'u aktif kaspaz-9'a çevirmekte, o da aktif kaspaz-6 oluşumu ile sonuçlanan kaspaz çağlayanını harekete geçirmektedir (116).

Görüldüğü gibi, her iki mekanizma da bir dizi kompleks moleküler etkileşim ile çalışmaktadır; her ikisi için de son ortak yol proteoliz özelliğine sahip kaspaz proteinlerinin aktive olmasıdır. Kaspaz aktivasyonu neticesinde hücre yoğunlaşır, membranda balonlaşmalar oluşur ve DNA fragmente olur. Sonunda hücre parçalanır ve çevredeki hücreler tarafından sindirilir (115).

P53'ün yukarıda sözü edilen mekanizmaların ikisinde de yer aldığı düşünülmektedir. DNA hasarından sonra aktive olan p53, dış mitokondrial membrandaki Bax adlı proapoptotik proteininin transkripsiyonunu aktive etmektedir; Bax ise mitokondriden sitokrom-c salınmasına ve apoptotik sürecin başlamasına yol açmaktadır. Diğer yandan, p53, CD95 transkripsiyonunu da



Şekil 5. Kaspaz aktivasyonu ile sonuçlanan iki apoptotik yolun şematik gösterimi. Bunların birincisinde Fas liganının Fas reseptörüne bağlanması ile reseptör oligomerizasyonu gerçekleşmekte ve FADD moleküllü aracılığı ile kaspaz-8 aktiflelenmektedir. Diğer yol ise mitokondri membranından sitokrom c salınması, bunun Apaf-1 ile bağlanması ve sonunda kaspaz-9 aktivasyonu ile karakterizedir (Kauffman SH, et al. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*, 256:42-49, 2000).

uyarabilmektedir. Görüldüğü gibi, p53'ün aktive olması hücre üzerinde iki farklı etki gösterebilmektedir: hücre siklusunun duraklaması ya da apoptosis. DNA hasarı söz konusu olduğunda bu etkilerden hangisinin ortaya çıkacağı muhtemelen hasarın şiddetine bağlıdır, hasar hafif ise tamirine zaman tanımak için siklus duraklatılmakta, aksi takdirde apoptosis tercih edilerek muhtemel bir onkogenetik süreç engellenmektedir (116).

2.4.4. P53 genindeki mutasyonların dağılımı

Özellikle kolon tümörlerinde yapılan çalışmalar, p53 mutasyonlarının büyük çoğunluğunun *missense* nokta mutasyonları olduğunu ve proteinin DNA'ya bağlanma bölgesini etkilediğini göstermiştir (şekil 4). Bu durum, daha çok erken *stop* kodon oluşmasına yol açan çerçeve kayması tipinde mutasyonların görüldüğü retinoblastoma, APC (Adult Poliposis Coli) geni gibi diğer tümör süpresörlerinden farklılık göstermektedir (117). Belirli bazı mutajenlerin p53 geninde kendilerine özgü mutasyonlar oluşturdukları gözlenmiştir, örneğin karaciğer tümörlerinde kodon 249 mutasyonu saptanması aflatoksin temasını göstermektedir(118).

Li-Fraumeni sendromu, p53 genindeki germline mutasyonlar neticesinde ortaya çıkan; meme, yumuşak doku sarkomları, beyin, lösemi ve osteosarkom gibi bir çok kanser türüne eğilim ile karakterize bir ailevi kanser sendromudur (119). Bu sendromdaki p53 mutasyon spektrumu büyük ölçüde sporadik kanserlerdekine benzemektedir: proteinin DNA'ya bağlanma bölgesinde yoğunlaşan nokta mutasyonları söz konusudur ve 175, 245, 248 ve 282. kodonlar özellikle etkilenmektedir (106). p53 geninde mutasyon saptanamayan Li-Fraumeni sendromlu bazı ailelerde ise CHK2 geninde mutasyon bulunmuştur (120).

Bu güne değin saptanmış olan p53 gen mutasyonlarını internetteki veri tabanlarında izlemek mümkündür (<http://www.iarc.fr/p53>). Halen (2002 yılında) 16000 üzerinde somatik ve 200 üzerinde germline p53 mutasyonu olduğu bilinmektedir.

2.4.5. P53 geni polimorfizmleri

P53 geninin aminoasit dizilimini etkilemeyen başlıca polimorfizmleri, C21T (2. ekson), G36A (4.ekson) ve A213G (6. ekson) nokta mutasyonlarıdır (*sessiz mutasyonlar*)(121).

Aminoasit dizilimini etkileyen önemli polimorfizmler ise C47T (prolin-serin; 4. ekson) ve G72C (arginin-prolin; 4. ekson) mutasyonlarıdır. Bunlardan özellikle G72C önemli olup başta serviks kanseri olmak üzere çeşitli kanser türleri ile ilişkisi üzerinde yoğun olarak durulmaktadır (122).

2.4.6. Malign melanom ve p53

Immunohistokimyasal boyama yöntemlerine dayanan ilk çalışmalar, diğer tümörler gibi malign melanomlarda da p53'ün yüksek oranda mutasyona uğradığını düşündürmüştür (8). Daha sonra yapılan ve çoğu Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) ve dizileme tekniğine dayanan çalışmalarda ise malign melanomlarda p53 mutasyonunun beklenenden seyrek olduğu bildirilmiştir: mutasyon görülme oranı tümör hücre kültürlerinde % 0- % 25 arasında, tümör dokusunda ise % 0- 15 arasında değişmektedir (9, 10, 11, 12). Bir çalışmada %21 gibi nispeten yüksek bir oran bildirilmiştir; ancak bu çalışmada metastazlardaki mutasyon sıklığının primer tümörden daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu mutasyonların tipi (C:G'den T:A'ya ya da CC:GG'den TT:AA'ya) ultraviyole (yani güneş ışığı) etkisini düşündürmektedir. Ayrıca güneş ışığına maruz kalan deri bölgelerindeki metastazlarda p53 mutasyonu görülebilirken iç organ metastazlarında hiç rastlanmamıştır. Bu bulgular, malign melanomda p53 mutasyonu görülebilse bile bunun onkogenik süreçte önemli bir rolü olmadığı ve güneş ışığı etkisi ile ortaya çıkan eşlikçi bir bulgu olduğu şeklinde yorumlanmıştır (123). Ancak, bazı melanom alt gruplarında p53 mutasyonlarının sanıldığından daha yüksek olabileceği ve patogeneizde rol oynayabileceğini iddia eden araştırmacılar da vardır (124).

2.5. ÇALIŞMADA KULLANILAN LABORATUVAR YÖNTEMLERİ

2.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Yöntemin temel prensibi, bir çift sarmal hedef DNA molekülünün (kalıp DNA), bu molekülü oluşturan iki ipliğin karşıt uçlarına spesifik olarak bağlanan primerler ve bir DNA polimeraz yardımıyla çoğaltılmasıdır. Reaksiyonun her bir döngüsü (siklus) 3 aşamadan oluşmaktadır; 1. aşamada ısı ile çift sarmalı oluşturan iplikler birbirinden ayrılmakta (denatürasyon), 2. aşamada ısı tekrar düşürülerek primerlerle artık birbirlerinden ayrılmış olan DNA ipliklerinin bağlanması sağlanmaktadır. Son aşamada, kullanılan DNA polimeraz (Taq polimeraz gibi) için optimum sıcaklıkta DNA sentezi gerçekleştirilir. Döngü sayısı genellikle 25-35 arasındadır. Reaksiyonun işleyişi sırasında hedef dizi üssel (exponential) olarak çoğalır (125).

Nested PCR: Kullanılan primerlerin özgün olmayan bağlanmaları istenmeyen PCR ürünlerinin oluşumuna yol açabilmektedir. "Nested PCR" bu sorunu giderebilmek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Burada, arka arkaya iki PCR reaksiyonu uygulanmaktadır; birinci PCR reaksiyonunun ürünü ikinci bir PCR reaksiyonu ile yeniden çoğaltılmaktadır. Ancak bu ikinci reaksiyonda kullanılan primerlerden biri ("semi-nested") ya da ikisi ("nested"), ilk reaksiyonda kullanılanlara göre daha "içeride" olan DNA dizilerine bağlanmaktadır. Birinci PCR ürünüde primerlerin non-spesifik olarak bağlanabileceği dizilerin var olması ihtimali zayıftır; bu nedenle ikinci PCR'da hedef DNA daha seçici olarak çoğaltılabilmektedir (126). Özellikle formalin ile fikse edilmiş ve parafin içinde saklanan dokulardan izole edilen genomik DNA'nın kalitesi çoğu kez bozuk olduğu için "nested" ya da (bu çalışmada olduğu gibi) "semi-nested" PCR uygulaması gerekebilmektedir.

2.5.2. Denatüre Edici Gradyentli Jel Elektroforezi

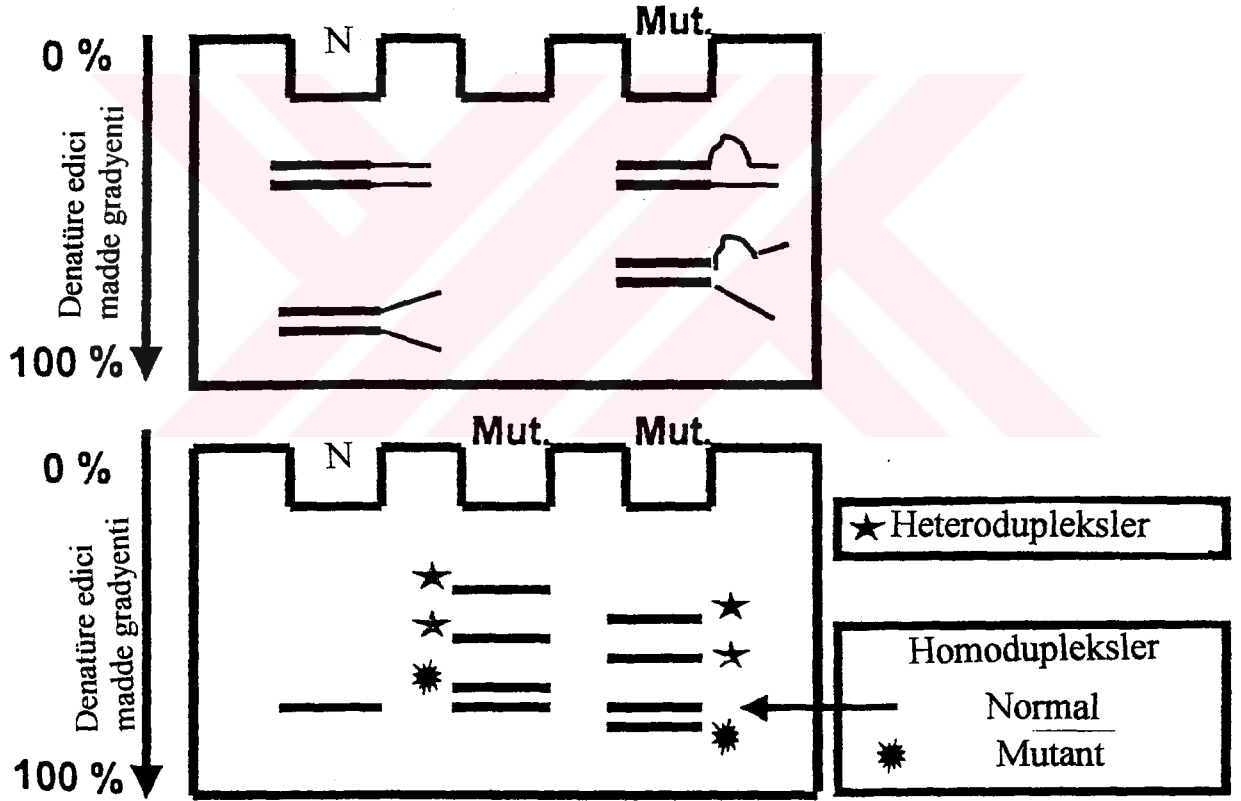
Polimeraz zincir reaksiyonu ile, mutasyonun araştırılacağı DNA bölgesi büyük miktarlarda çoğaltılabilir ve daha sonra nükleotid dizisi incelenebilir. Ancak, uzun DNA dizileri söz konusu olduğunda bu uygulama zorlaşmaktadır. Bu nedenle, hedef DNA molekülünün bölümler halinde incelenerek bunların hangisinde mutasyon olduğunun araştırılması esasına dayanan Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP), allel-spesifik amplifikasyon, RNAz kesimi gibi mutasyon tesbit yöntemleri geliştirilmiştir (127). Bu yöntemlerden bir diğeri de Denatüre Edici Gradyentli Jel Elektroforezi'dir (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; DGGE).

Yöntemin esası: Mutasyonun araştırılacağı çift sarmal DNA molekülünün PCR ile çoğaltılmasına ve denatüre edici madde içeren jel içinde, bu maddenin lineer olarak artan konsantrasyonun karşı elektroforeze tabi tutulmasına dayanır. Denatüre edici madde olarak çoğu kez formamid ve üre birlikte kullanılmaktadır. DNA molekülü jel içinde ilerlerken belli bir konuma eriştiğinde sarmal çözülmeye başlar (*erime; denatürasyon*). Bu noktadan itibaren DNA'nın jel içindeki hareketi son derece yavaşlar. Çözülmenin denatüre edici maddenin hangi konsantrasyonunda başlayacağını esas olarak DNA molekülünün baz dizilimi belirler. Bu konsantrasyon, o DNA molekülünün en kolay çözülen bölgesinin erime derecesine (T_m) karşılık

gelir. T_m , bir DNA çift sarmalındaki ipliklerin yarı yarıya çözüldüğü derecedir. GC baz çiftlerinden zengin dizilerde T_m yüksek, AT baz çiftlerinden zengin olanlarda ise düşüktür (128). Bir DNA dizisinin “erime haritası”nın çıkartılmasında, yani yüksek ve düşük T_m ’li bölgelerinin belirlenmesinde ve PCR reaksiyonunda kullanılacak primerlerin tasarımında MELT87, SQHTX gibi bilgisayar programlarından yararlanmak mümkündür (129).

DGGE ile, aralarında yalnızca tek bir baz farklılığı olan iki DNA segmentini dahi jel içerisinde ayırabilmek mümkündür. Örneğin bir “tek nükleotid polimorfizmi” (*single nucleotide polymorphism; SNP*) için heterozigot olan bireyin, PCR ile çoğaltılan DNA’sı DGGE ile incelendiğinde jelde 4 ayrı bant ayırt edilebilir. Bunların ikisi normal ve mutant *homodupleksler*, diğer ikisi de PCR reaksiyonu sırasında ortaya çıkan yanlış eşleştirilmiş (*mismatch*) baz çiftini içeren *heteroduplekslerdir* (Şekil 6). Heterodupleks DNA molekülleri, T_m ’leri daha düşük olduklarından elektroforez sırasında homoduplekslerin gerisinde kalırlar (128). Ancak yöntemin uygulanmasındaki bir sorun, aranan mutasyonun DNA dizisinin yüksek T_m ’li bölgesi içerisinde kalabilmesidir. Böyle bir durumda mutasyonu içeren ve içermeyen DNA dizileri DGGE’de aynı elektroforetik davranışı gösterecekler ve birbirlerinden ayırt edilemeyeceklerdir. İncelenecek diziye T_m ’i yüksek olduğu bilinen 40 baz çifti uzunluğundaki GC dinükleotid dizilerinin eklenmesi ile bu sorunun üstesinden gelinebileceği düşünülmüştür (*GC clamp; GC kısıkaçı*) (130). Bu amaçla PCR reaksiyonunda kullanılan primerlerden biri 5’ GC kısıkaçı içerecek şekilde tasarlanabilir, böylece PCR ürünü olan DNA molekülünün bir ucunda yüksek T_m ‘li GC bölgesi yer alacak, mutasyonun araştırılacağı DNA segmenti ise tümüyle düşük T_m bölgesinde kalacaktır. Bu şekilde, mutasyon tesbit oranı %100’e yaklaştırılabilmiştir (23).

Klinik genetikte DGGE’den özellikle mutasyon spektrumu heterojen olan ve de novo mutasyonların sık görüldüğü tek gen hastalıklarında yararlanılmıştır: β -talasemi, hemofili A ve B, kistik fibrozis gibi. DGGE kanser genetiğinde ise; k-ras, p53, APC gibi tümör süpresör ve onkogenlerin mutasyon taramasında kullanılmıştır (128). P53 için genellikle kullanılan yol genin tümüyle incelenmesi yerine 5-8. ya da 5-9. eksonların ayrı ayrı DGGE ile taranmasıdır,



Şekil 6. Normal ve mutant çift sarmal DNA moleküllerinin DGGE jelindeki hareketleri şeklin üst kısmında gösterilmiştir. İnce çizgiler hedef DNA molekülünü, kalın çizgiler ise "GC -kıskaçını" göstermektedir. GC'den zengin primerlerin kullanılması erime noktası yapay olarak yükseltilmiş bir DNA segmenti oluşturmaktadır. Şeklin alt bölümünde ise normal ve mutant homodupleks ve heterodupleks DNA moleküllerinin oluşturduğu 4 bant görülmektedir. Heterodupleks DNA molekülleri homodupleks DNA'dan daha önce erirler ve elektroforez sırasında onların gerisinde kalırlar(Sorensen SB. TP53 mutation analysis and LOH estimations on squamous cell carcinomas of the head and neck. Doktora tezi. Institute of Molecular and Structural Biology, University of Aarhus, 1999. Sayfa:18)

çünkü daha önce de değinildiği gibi proteinin DNA'ya bağlanma özelliğini etkiledikleri için mutasyonlar özellikle bu bölgede yoğunlaşmaktadır (131, 132).

2.5.3. DNA Dizilemesi

DNA dizilemesi 2 ayrı ilkeye göre yapılabilir. Bunlardan biri, Sanger tarafından tarif edilen *dideoksi-zincir sonlandırma metodu*, diğeri de Maxam ve Gilbert'in tarif ettiği *kimyasal degradasyon* metodudur. Dideoksi-zincir sonlandırma metodu daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemin esası; (i)nükleotit dizisi araştırılan ve kalıp görevi gören DNA molekülü (ii) deoksinükleotitler (dNTP; dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) ve (iii) dideoksinükleotitlerin (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) varlığında gerçekleştirilen DNA sentezine dayanır: yapay dideoksinükleotitler, uzamakta olan DNA zincirine eklendiklerinde, kendilerinden sonra başka bir nükleotidin eklenmesine engel olur ve zincirin uzamasını durdururlar. Sonuçta, hepsi değişik bir pozisyondaki nükleotitte uzaması sonlandırılmış karışık bir DNA molekülleri topluluğu ortaya çıkar, bunlar elektroforeze tabi tutulduklarında boylarına göre jelde sıralanırlar (Şekil 7). Bu sıralamadan da kalıp DNA'nın nükleotit dizisi çıkartılabilir. Radyoaktif ya da floresans veren maddelerle bu DNA moleküllerinin işaretlenmesi mümkündür (133, 134).

Bu çalışmada DNA dizilemesi floresans işaretleme yöntemi kullanılarak otomatik çözümleyici (ABI Prism 310 Genetic Analyzer) yardımıyla yapılmıştır, burada kullanılan dideoksinükleotitlere (ddNTP) floresans veren bir madde bağlanmıştır. Her bir dideoksinükleotit tipi (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) ayrı bir renk veren floresan madde ile işaretlenmiştir, dolayısı ile 4 ayrı renk söz konusudur. Kullanılan cihaz kapiller jel elektroforezi esasına göre çalışmaktadır; yukarıda tarif edildiği şekilde DNA sentezi sonrasında ortaya çıkan farklı uzunluklardaki DNA molekülleri kapiller tüpler içindeki jelde elektroforeze tabi tutulmakta ve verdikleri floresans, bir optik okuyucuda bulunan laser ışını tarafından buradan geçtikleri sırada saptanmaktadır. DNA molekülleri, bu pencere önünden geçmeden önce, elektroforez sırasında boylarına göre sıralandıklarından verdikleri floresans da bilgisayar tarafından aynı sıra ile kaydedilmektedir. Kaydedilen sinyaller dizisini (yani nükleotid dizisini) bilgisayar ekranında izlemek ve normal DNA dizisi ile kıyaslamak mümkündür.



55)

2.5.4. Floresans *in situ* Hibridizasyon (FISH)

FISH, metafaz kromozomlarında ya da interfaz nükleuslarında spesifik DNA dizilerinin saptanmasını sağlayan ve çok geniş kullanım alanı olan bir yöntemdir. En önemli özelliği, kullanılan problemlerin hedef DNA ile *in situ* olarak, yani hücre içinde interfaz nükleusları ya da metafaz kromozomları ile hibridize olmasıdır. Hem prob, hem de hedef, DNA ya da RNA dizilerinden oluşabilir; dolayısı ile DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-DNA ve RNA-RNA hibridizasyonlarına dayanan FISH uygulamaları mümkündür Rutinde en çok DNA-DNA FISH uygulanmaktadır. Komplementer çift sarmal DNA problemleri (cDNA problemleri) klonlanmış DNA plazmidlerinden restriksiyon enzim kesimi ile elde edilebilirler. Optimal prob uzunluğu 200-500 baz çifti olarak bildirilmektedir. Bununla birlikte 20-50 bazlık sentetik oligonükleotid problemler de kullanılmaktadır. Hibridizasyondan önce, hem hedef, hem de prob DNA'sının denatüre edilmesi gerekmektedir (135).

Problemler:

FISH problemleri başlıca 3 gruba ayrılmaktadır: alfa-satellit DNA problemleri (veya sentromerik problemler), kromozomu tümüyle "boyayan" problemler ve dizi spesifik problemler. Sentromerik problemler sayısal anomalilerin tesbitinde kullanılmaktadır ve hem interfaz nükleusları hem de metafaz kromozomlarına tatbik edilebilirler. Kromozomu tümüyle boyayan problemler, incelenecek kromozomun tamamına özgü bir çok tekrarlayıcı ve tek kopya dizileri birlikte içerirler (136). Bunlar metafaz kromozomlarında yapısal anomalilerin tesbitinde kullanılmaktadırlar. Dizi spesifik problemler ise, genomda bir başka kopyası olmayan ve çoğu kez bir geni kodlayan dizilerle hibridize olan lokus spesifik problemlerdir. Bu problemlerle mikrodelsiyonlar, translokasyonlar ve gen amplifikasyonları tesbit edilebilir. Bizim çalışmamızda p16 gen delesiyonunun değerlendirilmesinde hem lokusa hem de 9. kromozom sentromerine spesifik ikili (*dual*) prob, retinoblastoma ve CDK4 genlerinin değerlendirilmesinde ise yalnızca lokusa spesifik problemler kullanılmıştır.

Problemlerin işaretlenmesi:

Geçmişte radyonükleotid işaretli problemler kullanılmıştır (137). Günümüzde ise bunlar yerlerini hemen tümüyle ya kendileri doğrudan floresan bir madde ile (FITC, rodamin gibi) işaretli problemlere (direkt işaretleme), ya da biotin veya digoksinin gibi bir haptenle bağlı

problara bırakmışlardır (indirekt işaretleme). Hapten bağlı problemlerin kullanıldığı reaksiyonlarda, hibridizasyon sonrasında haptene spesifik ve floresan madde bağlanmış antikorlarının (streptavidin, avidin gibi) kullanılması gerekmektedir (136).

Formalinle fikse edilmiş ve parafin içinde saklanan dokularda FISH.

FISH, taze dokuda (kanda, kemik iliğinde, bukkal smirde) direkt olarak uygulanabilmektedir. Parafin bloklarda saklanan biyopsi örneklerinde FISH uygulaması ise ancak bazı ön işlemlerden sonra (*pretreatment*) mümkün olmakla birlikte özellikle retrospektif çalışmalarda kullanım alanı bulmaktadır(138).

Parafin bloktan hazırlanan kesitlerin çok ince ya da kalın olması değerlendirmeyi güçleştirmekte ve 4-5 mikron'luk kesit kalınlığının uygun olduğu bildirilmektedir Hibridizasyon öncesinde kesitlerin gece boyunca 65° C'de bekletilmesini tercih eden laboratuvarlar vardır. Parafinin giderilmesi için kesitler ksilenle bir kaç kez muamele edilmelidir. Dokunun dehidrate edilmesi için etanol (%70, 90 ve 100'lük seri halinde) kullanılmaktadır. Denatürasyondan önce dokunun proteinaz K ya da pepsin ile muamele edilmesi gerekmektedir (135, 136). Ticari olarak temin edilebilen ve materyali hibridizasyona hazır hale getiren kitlerin yaygınlaşması uygulamayı nisbeten kolaylaştırmıştır .

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HASTALAR

Çalışmada malign melanomlu 15 hastanın parafin blok içinde saklanan biyopsi örneklerinde p53, retinoblastoma, p16 tümör süpresör genleri ile CDK4 onkogenleri incelendi. P53 genindeki mutasyonlar DGGE ve dizileme, retinoblastoma ve p16 gen delesyonu ve CDK4 gen amplifikasyonu da FISH yöntemi ile değerlendirildi. Çalışmanın deneysel bölümü, Danimarka'nın Arhus kentinde bulunan "Arhus University Hospital"da yürütüldü. Hastaların 11'i kadın, 4'ü erkekti (ortalama yaş: 46 ± 18 yıl). Biyopsi alındığı sırada hastalığın yaygınlığı bu olgulardan 3'ünde evre I, 8'inde evre II, 3'ünde evre III ve 1'inde de evre IV olarak belirlenmişti. Biyopsi örneklerinden en eskisi 1991, en yenisi de 1997 yılında alınmıştı. Hastalara ait klinik ve demografik veriler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Hastaların yaş, cinsiyet ve biyopsi alındığı sıradaki hastalık evrelemesi görülmektedir. Ortalama yaş: 46 ± 18 yıl; kadın/erkek: 11/4. K: Kadın; E:erkek.

Hasta No	Yaş (yıl)	Cins	Evre
1	17	K	III
2	46	K	IV
3	57	K	I
4	32	K	II
5	27	E	II
6	55	K	I
7	39	E	II
8	55	E	III
9	70	K	II
10	42	K	I
11	40	E	II
12	25	K	I
13	85	K	II
14	61	K	III
15	32	K	II

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. P53 Gen Mutasyonlarının DGGE ve Dizileme (Sequencing) ile İncelenmesi

- I. Parafin blok halinde saklanan biyopsi materyalinden genomik DNA izolasyonu
- II. Genomik DNA ile agaroz jelinde test elektroforezi
- III. Genomik DNA'nın "semi-nested PCR" ile çoğaltılması
- IV. Semi-nested PCR ürününe test jel elektroforezi uygulanması
- V. DGGE ve mutasyon patemi gösteren bantların kesilmesi
- VI. Kesilen bantlardaki DNA'nın III. PCR ile çoğaltılması
- VII. Test agaroz jeli ve jelden bantların kesilmesi ve DNA'nın ayrılması
- VIII. Anlamlı (sense) ve karşıt anlamlı (anti-sense) DNA ipliklerinin amplifikasyonu
- IX. DNA'nın etanol ve sodyum asetat ile çöktürülmesi
- X. Dizileme

DGGE ve dizileme ile mutasyonların tanımlanmasında izlenmiş olan strateji ana hatları ile Şekil 8'de gösterilmiştir.

I. Parafin blok halinde saklanan biyopsi materyalinden DNA izolasyonu:

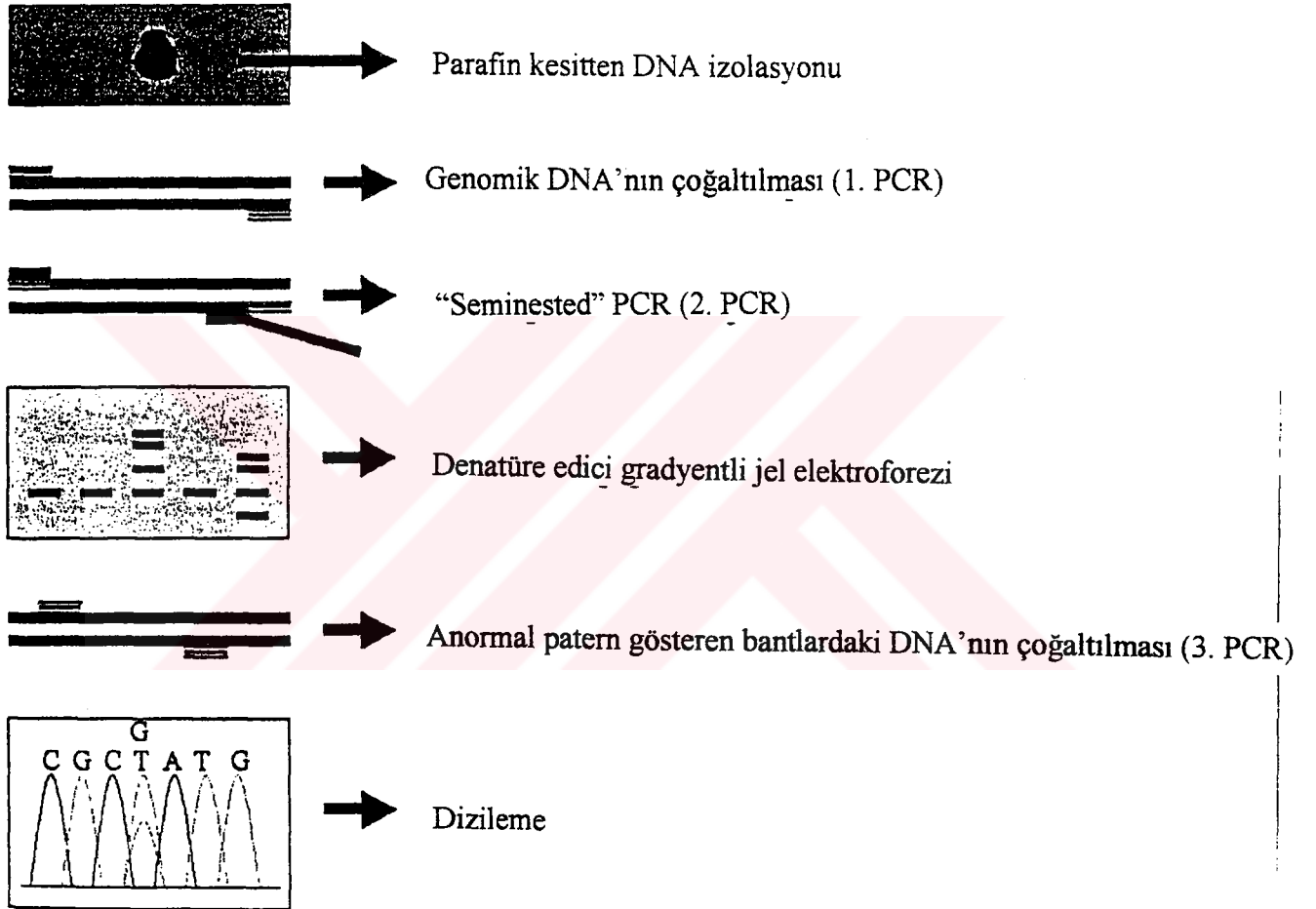
DNA izolasyonu, "NucleoSpin C&T" kiti ile (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren-Germany. Katalog no: 740952) kit protokolüne göre gerçekleştirildi.

II. Genomik DNA ile agaroz jelinde test elektroforezi:

Yeterli miktarda genomik DNA elde edilip edilmediğini görebilmek amacıyla test agaroz jeli uygulandı. Örnekler, etidyum bromid içeren %1'lik agaroz jeline „loading buffer“ ile yüklendi: her bir kuyucuğa 5 µl H₂O + 5 µl krezol kırmızısı + 5 µl genomik DNA kondu ve 40 dakika elektroforez uygulandı (70 V, 200 A).

III. Genomik DNA'nın "semi-nested PCR" ile çoğaltılması:

p53 geninin 5, 6, 7, 8, ve 9. eksonları semi-nested PCR ile çoğaltıldı. 5C eksonu çok uzun olduğu için iki ayrı parça halinde (amino tarafı: 5N ve karaboksil tarafı:5C) çoğaltıldı. İkinci PCR'da kullanılan primerlerden biri "GC kıskacı" oluşturulabilmesi için GC nükleotitlerinden zengindir (Bakınız Ekler: kullanılan primerler).



Şekil 8. DGGE ve dizileme ile P53 mutasyonlarının tesbitinde izlenen yolun şematik gösterimi (Sorensen SB. TP53 mutation analysis and LOH estimations on squamous cell carcinomas of the head and neck. Doktora tezi. Institute of Molecular and Structural Biology, University of Arhus, 1999. Sayfa:16).

I. PCR**Reaksiyon karışımı:**

- 10X Pfu polimeraz tamponu: 2.5 µl (son konsantrasyon 1X)
- DMSO: 1.25 µl (son konsantrasyon : %5)
- Pfu polimeraz (2.5 U/µl'lik solüsyondan): 0.5 µl (son konsantrasyon : 0.05 U/µl)
- Betaine (5M): 6 µl (son konsantrasyon: 1.2 M)
- "Sense" primer (50 pmol/µl) : 0.2 µl (son konsantrasyon: 0.4 µM).
- "Antisense" primer (50 pmol/µl): 0.2 µl (son konsantrasyon: 0.4 µM).
- dNTP (1.25 mM): 4 µl (son konsantrasyon: 0.2 mM)
- Genomik DNA: 50-200 ng (1 µl)
- Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde dH₂O eklendi.

I. PCR'in aşamaları:

Aşama	Basamak	Siklus	İşlem
1	1	1	Başlangıç denatürasyonu (96° C'de 45 sn.)
2	1	30	Denatürasyon (96° C'de 45 saniye)
	2		Bağlanma (63° C'de 45 saniye)
	3		Uzama (72 ° C'de 45 saniye)
3	1	1	Uzama (72 ° C'de 10 dakika)

II. PCR**Reaksiyon karışımı:**

- AmpliTaq 10X Gold polimeraz tamponu: 5 µl (son konsantrasyon : 1X)
- AmpliTaq Gold Polimeraz (5 U/µl'lik solüsyondan): 0.2 µl (son konsantrasyon :0.02U/µl)
- DMSO: 2.5 µl (son konsantrasyon : %5)
- Krezol kırmızısı: 10 µl (son konsantrasyon : %20)
- Sense primer(50 pmol/µl'lik solüsyondan): 0.8 µl (son konsantrasyon:0.8 µM)
- Antisense primer (50 pmol/µl'lik solüsyondan): 0.8 µl (son konsantrasyon:0.8 µM)
- DNTP (1.25 mM'lik solüsyondan): 8 µl (son konsantrasyon: 0.2mM)
- 1. PCR ürünü DNA: 2 µl
- Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde dH₂O eklendi

II. PCR'in aşamaları:

Aşama	Basamak	Siklus	İşlem
1	1	1	Başlangıç denatürasyonu (96° C'de 10 dk.)
2	1	40	Denatürasyon (96° C'de 15 saniye)
	2		Bağlanma (62 ° C'de 45 saniye)
	3		Uzama (72 ° C'de 45 saniye)
3	1	1	Uzama (72 ° C'de 10 dakika)

IV. Semi-nested PCR ürününe test jel elektroforezi uygulanması :

TAE içinde %1 agaroz jeli hazırlandı. Birinci kuyucuğa 3µl marker DNA + 2 µl krezol kırmızısı, diğer kuyucuklara 5 µl PCR ürünü kondu. 70 V, 200 A ve 40 dakika elektroforez uygulandı.

V. DGGE ve mutasyon paterni gösteren bantların kesilmesi

A) Kullanılan kimyasal maddeler ve karışımlar:

- % 40 akrilamid
- Üre
- Formamid
- 50X TAE tamponu: Tris base 242.0 g
Glasial asetik asit 57.1 ml
0.5 MEDTA, pH 8.0 100.0
Karıştırılır ve dH2O ile 1 Litre'ye tamamlanır.

• % 100'lük denatüre edici madde karışımı: Denatüre edici madde olarak formamid ve üre kullanıldı. Formamid konsantrasyonunun % 40 ve üre konsantrasyonunun 7M olduğu solüsyon %100'lük denatürasyon solüsyonu olarak tanımlandı. Bu tanıma göre ekson 5C, 5N ve 7 için % 35 ve % 80'lik (gradyent: %80-%30 = %45); ve 6, 8 ve 9 için de % 20 ve % 75'lik (gradyent: %75 – %20 = %55) denatüran madde solüsyonları hazırlandı. Akrilamid konsantrasyonu, denatüran madde konsantrasyonunun %20 ve %35 olduğu solüsyonlarda %6; %75 ve % 80 olduğu solüsyonlarda da % 12 olarak ayarlandı:

Tablo 3: Çeşitli konsantrasyonlarda denatüran madde içeren karışımların içeriği görülmektedir.

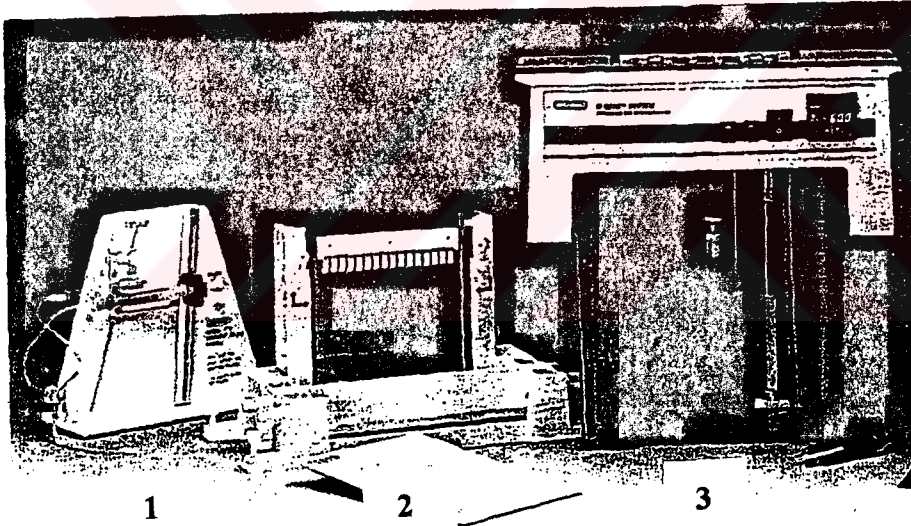
Denatüran Madde konsantrasyonu (%)	50X TAE tamponu (ml)	Formamid (ml)	Üre (g)	%40 akrilamid (ml)	DH2O ilavesi ile elde edilen final solüsyon (ml)
20	4	16	16.8	30	200
35	4	28	29.4	30	200
75	4	60	63.0	60	200
80	4	64	67.2	60	200

- % 10 amonyum persulfat: Amonyum persulfat 0.4 g
DH2O 4.0 ml
- Bromofenol mavisi ve ksilen syanol içeren boya solüsyonu: Bromophenol Blue-Xylene Cyanol Dye Solution.
- 1X TAE yükleme tamponu (7 L): 50X TAE tamponu 140 ml
DH2O 6860 ml
- N, N, N'-Tetra-methyl-ethylenediamine (TEMED).

B. DGGE'nin uygulanışı:

DGGE, "GENE DENATURATING ELECTROPHORESIS SYSTEM (Bio-Rad Laboratories. Kopenhag, Danimarka)" ile gerçekleştirildi (Şekil 9). Özetle, iki deney tüpü alınarak biri "düşük" diğeri de "yüksek" konsantrasyon tübü olarak belirlendi ve düşük konsantrasyon tübüne 50 µl boya solüsyonu kondu. Daha sonra her iki tüpe 140 µl %10 amonyum persulfat ve 14 µl TEMED kondu. Oluşturulmak istenen gradyent büyüklüğüne göre düşük ve yüksek konsantrasyon tüplerine uygun konsantrasyonda 14 ml denatüran madde kondu (örneğin 7. Ekson için %35 ve % 80'lik denatüran madde) . Sistem tarafından sağlanan düzenele oluşturulan cam sandviçin içine, gradyent oluşturucu cihaz yardımıyla denatüran madde dolduruldu (Şekil 9). Jelin donması (yaklaşık 30-40 dakika) beklendi. Daha sonra kuyucuklara 20 µl nested PCR ürünü kondu ve sandviç 1X TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Örnekler yaklaşık 19-20 saat boyunca toplam 1050 volt verilecek şekilde elektroforez uygulandı. Bu sırada tankın sıcaklığı 65 derecede sabit tutuldu. Elektroforez sonrasında sandviçler tankın içerisinden alındı ve camlar birbirinden ayrılarak jel tabakası

sandviçin içerisinde çıkarıldı. Jel önce bir kaç damla etidyum bromid eklenmiş 1XTAE tamponu içeren kaptan 5 dakika ve daha sonra da dH₂O içeren bir başka kaptan 10 dakika bekletildi. Daha sonra ultraviyole ışık altında incelendi ve mutasyon paterni gösteren bantlar bisturi ile kesilip 200 µl dH₂O içeren tüplerde 24 saat bekletilerek jelin çözülmesi sağlandı. Bu tüplerde bulunan DNA üçüncü bir PCR ile (III. PCR) çoğaltıldı.



Şekil 9. Bir DGGE sistemi . Bir numaralı parça cam sandviç arasına gradyent oluşturarak jelin dökülmesini sağlayan cihazdır, 2 numaralı parça ise cam sandviç ve onu bir arada tutan unsurlardan oluşmaktadır. Üç numaralı parça elektroforez tankıdır ("D GENE™ Denaturing Gel Electrophoresis System" kullanım kılavuzu. Katalog No:170-9000/170-9070. Bio-Rad Laboratories, Danimarka).

VI. Kesilen bantların PCR ile çoğaltılması (III. PCR):

Reaksiyon karışımı:

- 10X Gold polimeraz tamponu: 2.5 µl (son konsantrasyon: 1X)
- Gold Polimeraz (5 U/µl'lik solusyondan): 0.1 µl (son konsantrasyon: 0.02 U/µl)
- Krezol kırmızısı: 5 µl (son konsantrasyon: %20)
- Sense primer(50 pmol/µl'lik solusyondan): 0.1 µl (son konsantrasyon: 0.2 µM)
- Antisense primer (50 pmol/µl'lik solusyondan): 0.1 µl (son konsantrasyon: 0.2 µM)
- DNTP (1.25 mM'lik solusyondan): 1 µl (son konsantrasyon: 0.05mM)
- DNA: 1 µl
- Toplam hacim 25 µl'ye tamamlanacak şekilde dH₂O eklendi).

III. PCR'ın aşamaları:

Aşama	Basamak	Siklus	İşlem
1	1	1	Başlangıç denatürasyonu denatürasyon (96° C'de 10 dakika)
2	1	40	Denatürasyon (96° C'de 15 saniye)
	2		Bağlanma (62 ° C'de 45 saniye)
	3		Uzama (72 ° C'de 45 saniye)
3	1	1	Uzama (72 ° C'de 10 dakika)

VII. Test agaroz jeli ve jelden bantların kesilmesi ve DNA'nın ayrılması :

III. PCR ürününe TAE içindeki %1 agaroz jelinde elektroforez uygulandı (70 V, 200 A ve 40 dakika). Elektroforez sonucunda ortaya çıkan bantlar kesilerek çıkartıldı ve jelden "QIAquick Gel Extraction" kiti ile DNA izolasyonu (kit protokolüne göre) uygulandı.

VIII. Anlamli (sense) ve karşıt anlamli (anti-sense) DNA ipliklerinin amplifikasyonu

Her örnek için, birinde anlamli, diğerinde de karşıt anlamli DNA ipliğinin çoğaltıldığı iki ayrı reaksiyon tüpü hazırlandı.

Reaksiyon karışımı:

Primer: 0.8 pmol/L içeren karışımdan 2 µl.

Terminator Mix (ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit):

4 µl

DH2O: 2.5 µl

DNA: 1.5 µl

Toplam reaksiyon hacmi: 10 µl

Reaksiyon koşulları:

10 saniye 96° C, 5 saniye 50° C, 4 dakika 60° C 25 siklus boyunca uygulandı.

IX. DNA'nın etanol ve sodyum asetat ile çöktürülmesi

- 10 µl DNA, 25 µl % 96 etanol ve 1 µl 3M sodyum asetat ile karıştırılıp vortekslendi ve 10 dakika buz içerisinde bekletildi.
- Örnekler 15 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi.
- Süpernatant döküldükten sonra örnekler 200 µl %70 etanol eklendi ve 5 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi.
- Süpernatant döküldü ve örnekler etanol tamamen uçana kadar (ertesi güne değin) bekletildi.
- Örnekler 20 µl „template supression agent“ ile yeniden süspanse edildi.
- Kuvvetle vortekslendikten sonra 3000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 96 ° C'de 2 dakika bekletildi, 3000 rpm'de yeniden 1 dakika santrifüj edildi
- Önce 96 ° C'de 2 dakika ve daha sonra da buz içerisinde 2 dakika bekletildi.

X. Dizileme

Dizileme ABI Prism 310 Genetic Analyser cihazı ile yapıldı.

3.2.2. FISH yöntemi ile p16, Retinoblastoma ve CDK4 genlerinin incelenmesi**I. Problar**

Çalışmada p16 gen delesyonunun değerlendirilmesinde hem lokusa hem de 9. kromozom sentromerine spesifik ikili (*dual*) prob, retinoblastoma ve CDK4 genlerinin değerlendirilmesinde ise yalnızca lokusa spesifik problar kullanılmıştır. P16 ve retinoblastoma genleri için ticari olarak mevcut problar kullanılmıştır. CDK4 onkogen amplifikasyonu ise BAC klonlama yöntemi ile elde edilmiş dizi spesifik probla incelenmiştir. Prob “nick translation” yöntemi ile işaretlenmiştir.

CDK4 probunun “nick translation” yöntemi ile işaretlenmesi:

i. Reaksiyon karışımı:

• BAC DNA'sı	3.4 µl
• Labeling Mix: (Her biri 2.5 mM olan 5µl dATP + 5µl dCTP + 5µl dGTP + 3.4 µl dTTP + 4 µl Fluorescein-UTP + 27.6 µl dH ₂ O)	4 µl
• Nick translasyon mix	4 µl
• sdH ₂ O	8.6 µl
• Toplam	20 µl

ii. Inkübasyon koşulları: 14 °C, 60 dk.

iii. Test elektroforezi:

Inkübasyon sonrasında DNA fragmentlerinin istenilen boyutta (300-500 bazçifti) olup olmadığını kontrol etmek amacı ile 4 µl DNA, %1 agaroz jelinde (0.5 g agar + 50 ml TBE + 0.2 µl etidyum bromid) içinde marker DNA ile birlikte elektroforeze tabi tutuldu (80 volt, 1 saat). Ultraviyole ışık ile incelenen jelde, DNA fragmentlerinin istenen boyutta olduğu görülmüyordu.

iv. Presipitasyon:

100-200 bazçifti gibi problemler, Alu ve L1 tekrarlayıcı dizilerinden zengin olduğundan özgün olmayan bağlanmalar görülebilmektedir. Bu tarz bağlanmaları engellemek üzere, tekrarlayan dizilerden zengin DNA (CotI DNA ve Salmon DNA) ile presipitasyon yapılmıştır:

• Cot I DNA:	2.6 µl
• Salmon DNA:	2.6 µl
• Amonyum asetat (3M)	0.8 µl
• DNA	2 µl
• 100 % alkol	20 µl

Karışım -20 °C de gece boyunca bekletildi veya -70 °C de 1-2 saat inkübe edildi.

II. Parafin blokların FISH öncesi geçirildiği ön işlemler:

1. Parafin bloklardan 5 mikronluk kesitler alındı.
2. Ksilen içinde 3x10 dk. deparafinizasyon uygulandı.

3. %100 alkol içinde 2x5 dk. bekletildi.
4. Oda ısısında kurutuldu.
5. 0.2M HCl içinde 20 dk. bekletildi.
6. ddH₂O içinde 3 dk. yıkandı.
7. 0.25 mg/ml proteinaz K solüsyonunda (pH 7.4 PBS içinde) 37 °C'de 40 dk. bekletildi.
8. 2xSSC içinde 3 kez yıkandı (3 x2 dk).
9. Etanol serisinden geçirildi (her birinde 2 dk olmak üzere %70, 90 ve 100%'lük alkol içinde bekletildi) ve "hot plate" (37 derece) üzerinde kesitler kurutuldu .
10. 10% formalin içinde oda ısısında 10 dk. kurutuldu.
11. 2xSSC de 2x5 dk.
12. 37°C'de kurutma.
13. Denatürasyon: 100µl 1x Tth polimeraz veya başka bir polimeraz buffer ile 94°C'de 5 dk.
14. -20 °C'de soğutulmuş ETOH serisinden geçirildi.
15. 37°C'de kurutuldu.
16. 1x PBS içinde 10 microlt/ml Proteinaz K ile 37 derecede 10dk . muamele edildi
17. 37°C'de kurutuldu.

III. Hibridizasyon:

A. P16 dual probu ve Rb probu ile hibridizasyon

1. 1 µl probe + 2 µl sdH₂O + 7 µl hibridizasyon tamponu eklendi, lamelle kapatılıp yapıştırıldı ve 37 °C'de gece boyu nemli ortamda bekletildi.
2. Ertesi gün lameller çıkartıldı 2xSSC içinde 72 derecede 5dk yıkandı
3. 16 µl DAPI ilavesi ve değerlendirme.

B. CDK4 probu ile hibridizasyon

1. -20 °C'de gece boyu bekletilen presipitasyon karışımı ertesi gün 4 °C'de 20 dakika santrifüj edildi.
2. Süpernatant pipetleyerek atıldı. Sonra 2 kere % 70 ETOH ile yıkandı.
3. 37 °C'de kurutuldu.

4. 10 µl mastermiks (%50 formamid + %10 Dextran 2xSSC içinde) eklendi ve vortekslendi.
5. Denatürasyon: 72 ° C'de 5 dk.
6. Preannealing: 37 °C'de 30 dk.
7. Daha önce denatüre edilmiş target DNA'nın bulunduğu lam 37 °C'ye ısıtılmış hot plate üzerinde iken biotin veya digoksigenin işaretli probdan 5'er µl kondu. Etrafı zamlandı, zamlı kuruduktan sonra 37 °C'de gece boyunca bekletildi.
8. Ertesi gün lameller çıkartıldı ve 2xSSC içinde 72 derecede 5dk yıkandı.
9. Yıkama tamponu (200 ml 20XSSC + 2.5 ml % 0.05 Tween 20, distile suyla 1 litreye tamamlanır) içinde 1 dk. bekletilip soğutuldu.
10. 25 µl AvF (Avidin-Fluorescein) hedef doku üzerine kondu ve 30' karanlıkta bekletildi.
11. Yıkama tamponu ile tekrar yıkandı.
12. 16 µl DAPI ilavesi ve değerlendirildi.

IV. Değerlendirme

Değerlendirme her gen için ayrı ayrı 50 hücre üzerinden yapıldı. P16 geninin dual prob ile yapılan değerlendirmesinde, normalde her hücrede p16 lokusuna spesifik probdan kaynaklanan iki kırmızı sinyal ve sentromerik probdan kaynaklanan iki yeşil sinyal beklenmektedir. Örneğin, bir hücrede iki yeşil sinyalin (sentromer) izlenmesine rağmen tek kırmızı sinyalin (p16 lokusu) izlenmesi, spesifik olarak p16 gen kaybı şeklinde değerlendirilmiştir. Retinoblastoma geninin değerlendirilmesinde kullanılan prob dual olmadığı için, bir hücrede, normalde olması gereken 2 yerine tek ya da hiç sinyal izlenememesi durumunda gen delesyonu/kromozom kaybı ayırımı yapılamasa da, genin 1 (ya da 2) kopyasının eksilmiştir olduğuna karar verildi. CDK4 geninin değerlendirilmesinde, mitoz halindeki hücrelerde bir genin kopya sayısının normal olarak dört kadar çıkabileceği dikkate alınarak, 5 ya da üzerindeki sinyal artışları amplifikasyon olarak yorumlandı (139).

4. SONUÇLAR

4.1. P53 GENİ (DGGE ve DİZİLEME)

4.1.1. Genomik DNA düzey tayini:

Parafin kesitlerden elde edilen genomik DNA konsantrasyonları Tablo 4’de gösterilmiştir. Hasta no 3 ve 4’de ölçülebilir düzeyin altında DNA olduğu görülmüştür.

Tablo 4. Parafin kesitlerden izole edilen DNA konsantrasyonları.

Hasta no	ng/μl
1	2,5
2	2,4
3	ölçülemedi
4	1,4
5	ölçülemedi
6	5,7
7	10
8	2,7
9	2,5
10	11
11	1,9
12	1,5
13	1,7
14	5,8
15	1,3

4.1.2. DGGE’de anormal patern gösteren hasta ve eksonlar

5. ekson karboksil ucu(5C): 3, 5, 9 ve 12 No’lu hastalarda ikişer bant anormal patern göstermiştir.

5. ekson amino ucu (5N): Hiçbir hastada anormal patern görülmemiştir.

6. ekson: 1 No’lu hastada 2, 2 No’lu hastada 3, 6 No’lu hastada 3 ve 9 No’lu hastada 5 adet anormal patern gösteren bant mevcuttur.

7. ekson: Yalnızca 4 No’lu hastada 3 adet anormal paternli bant görülmüştür.

8. ekson: Yalnızca 13 No’lu hastada 3 adet anormal bant görülmüştür.

9. ekson: Yalnızca 1 No’lu hastada 1 adet anormal bant görülmüştür (Şekil 10-15) (Tablo 5).

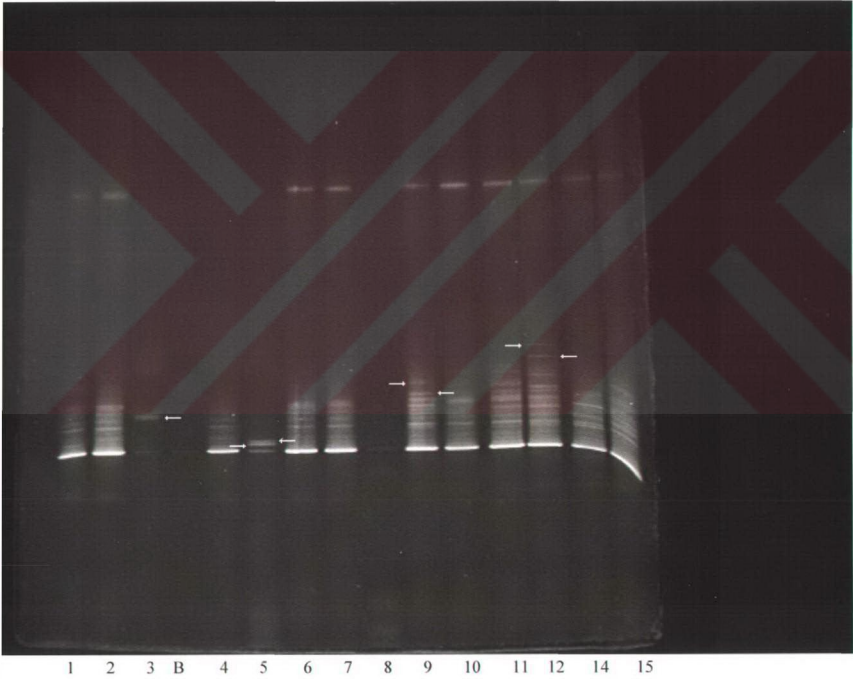
DGGE paternlerinin incelenmesinde genel olarak 3, 5 ve 8 no'lu hastalarda ayırt edilebilir bantların izlenemediği dikkati çekmiştir; bu hastaların ilk ikisinde DNA düzeyi ölçülebilir düzeyin altındadır; 8 numaralı hastada ise 2.5 ng/μl olarak hesaplanmıştır.

Tablo 5. DGGE neticesinde anormal bant saptanan hasta ve eksonlar ile kesilen bant sayısı gösterilmiştir. Örneğin 5C eksonu için yapılan DGGE'de 3, 5, 9 ve 12 numaralı hastalarda ikişer adet anormal patern gösteren bant saptanmış ve jelden kesilmiştir. 5N eksonunun DGGE ile taranmasında ise hiç bir hastada anormal patern görülmemiştir.

Hasta No	Ekson					
	5C	5N	6	7	8	9
1	-	-	2	-	-	1
2	-	-	3	-	-	-
3	2	-	-	-	-	-
4	-	-	-	3	-	-
5	2	-	-	-	-	-
6	-	-	3	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	2	-	5	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	2	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	3	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-

4.1.3. Dizileme

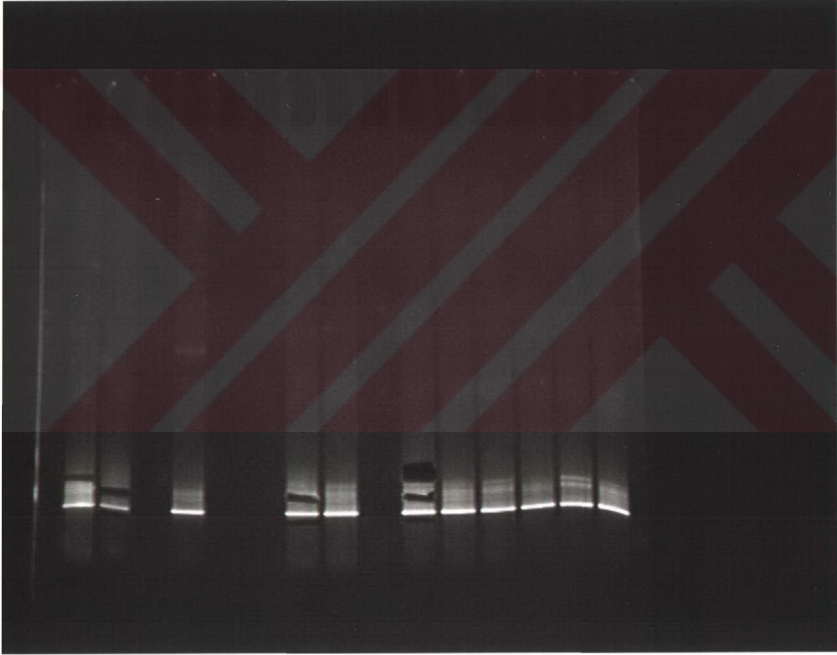
Anormal patern gösteren bantlardan elde edilen DNA'nın dizilenmesi neticesinde 6. eksonda 3 hastada (hasta no 2, 6 ve 13) 213. kodonda nokta mutasyonu saptanmıştır (CGA→CGG). Hem CGA, hem de CGG *arginin*'i kodladığından proteinin aminoasit dizilimi değişmemektedir (*sessiz mutasyon*).



Şekil 10. 1-14 no'lu hastaların 5. eksonun karboksil (5C) ucuna ait DGGE: 3, 5, 9 ve 12 no'lu hastalarda "genel" paternin dışında kalan bantlar görülmüştür (her birinde ikişer bant). Üç numaralı hastadaki iki bant birbirine çok yakındır. Dördüncü kuyucuk işaretleme amacıyla boş bırakılmıştır ("B" ile gösterilmiştir). 15 no'lu hastaya ait 5C eksonu DGGE'si başka bir deneyde incelenmiş ve anormal pattern göstermemiştir.

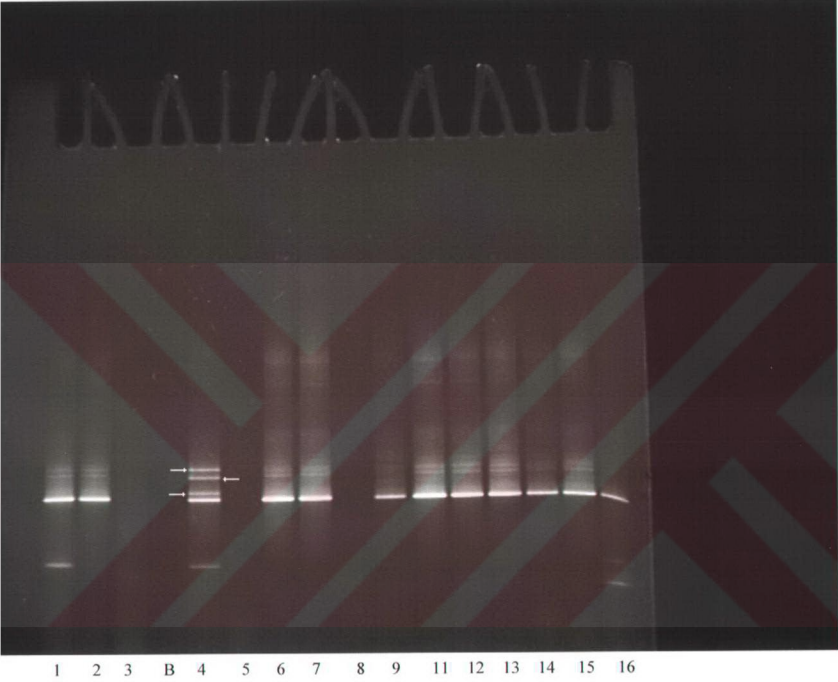


Şekil 11. 1-14 no'lu hastaların 6. eksonuna ait DGGE. 1, 2, 6 ve 9 no'lu hastalarda anormal patern gösteren bantlar izlenmektedir: sırasıyla 2, 3, 3, ve 5 bant. Bir numaralı hastadaki iki bant birbirine çok yakın ve çok ince olup izlenmesi güçtür. Beşinci kuyucuk boş bırakılarak işaret görevi görmesi sağlanmıştır ("B" ile gösterilmiştir). 15 no'lu hastanın 6. ekson DGGE'si başka bir deneyde incelenmiş ve anormal patern göstermemiştir.

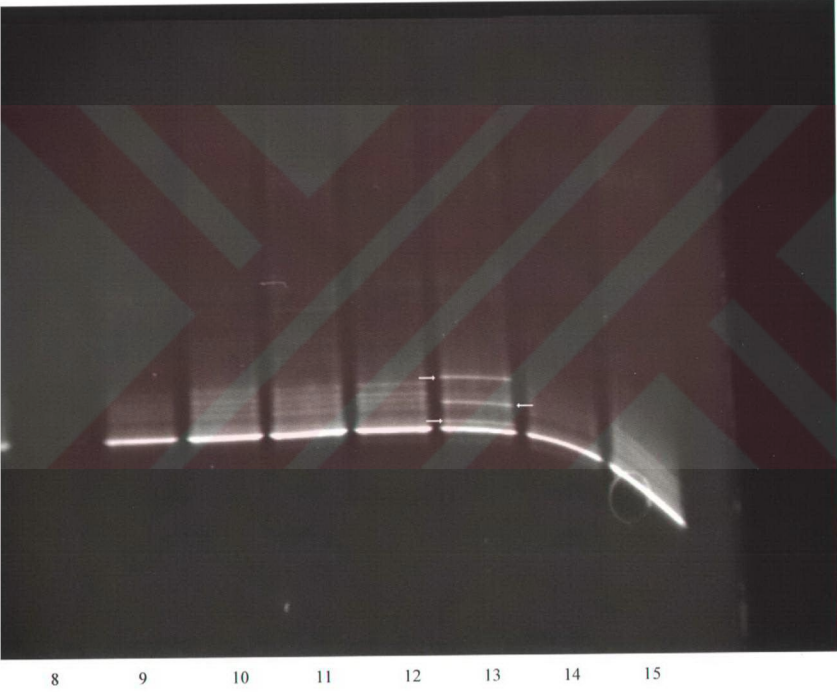


1 2 3 4 B 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

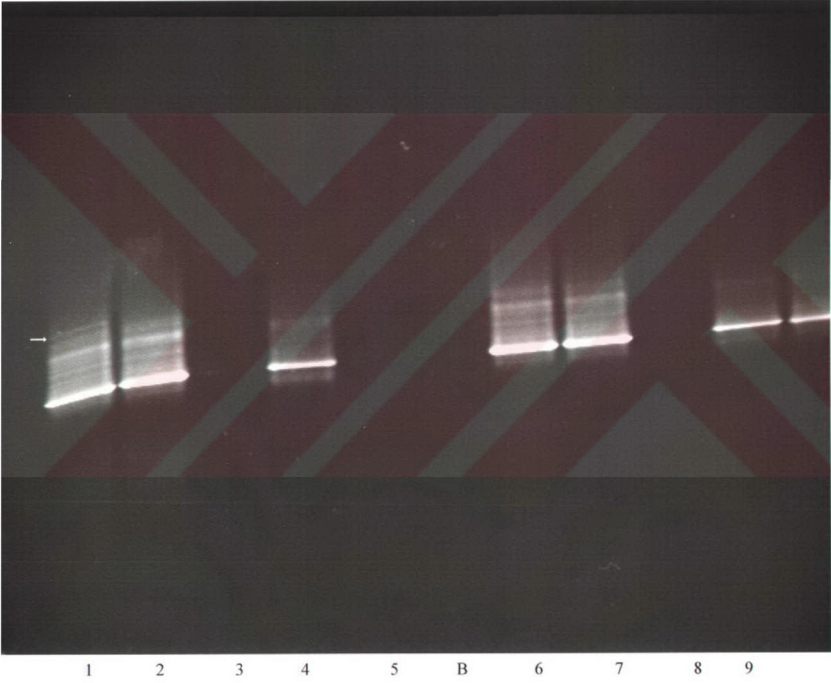
Şekil 12. 6. ekson DGGE'sinde görülen anormal paternli bantların kesilmesinden sonra alınan fotoğraf. Bir numaralı hastadan 2, iki numaralı hastadan 3; altı numaralı hastadan 3 ve 9 numaralı hastadan 5 bant kesilmiştir.



Şekil 13. 7. eksona ait DGGE. Yalnızca 4 no'lu hastada üç anormal bant görülmektedir. Dördüncü kuyucuk işaretleme amacıyla boş bırakılmıştır.



Şekil 14: 8-15 no'lu hastalara ait 8. ekson DGGE'si. Yedi numaralı hastanın da DGGE'si kısmen gözükmetedir. 13 no'lu hastada 3 adet anormal patern gösteren bant izlenmektedir.



Şekil 15. 1-9 no'lu hastaların 9. ekson DGGE'si. Altıncı kuyucuk işaretleme amacı ile boş bırakılmıştır. Yalnızca 1 no'lu hastada tek bir anormal bant mevcuttur. 10-15 no'lu hastalara ait DGGE fotoğrafın dışında olup bunlarda anormal paternli bant görülmemiştir (10 numaralı hastanın DGGE'si kısmen izlenebilmektedir).

4.2. P16, RETİNOBLASTOMA VE CDK4 GENLERİ (FISH)

İki hastada (hasta no 6 ve 10) patolojik incelemede yeterli tümör dokusu saptanamaması, 3 hastada da (hasta no 10, 13, 15) hibridizasyon sağlanamaması nedeni ile FISH uygulaması 10 hastada gerçekleştirilebilmiştir.

4.2.1. P16 geni

Dual prob ile yapılan incelemede her bir hücrede sayılan sentromerik sinyallerin sayısı (a) ve p16 sinyallerinin de sayısı (b) “a/b” ifadesi içinde gösterilmiştir. Normal olarak beklenen değer “2/2”dir. Diğer yandan, örneğin, 2/1 oranı 9. kromozomun her iki kopyasının da hücrede mevcut olduğunu, ancak iki p16 lokusundan birinin delesyona uğradığını göstermektedir. Altı hastada (2, 3, 4, 5, 7 ve 12 no’lu hastalar) değerlendirilen hücrelerin büyük çoğunluğunda iki sentromerik sinyale karşılık iki p16 sinyali (2/2) görülmüştür. Görülme yüzdesi %66-94 arasında değişmektedir. Bu hastalarda önemli oranda p16 delesyonu olmadığı görülmektedir: iki sentromerik sinyale karşılık tek p16 sinyalinin (2/1) görüldüğü hücrelerin oranı yalnızca % 6-10; 2/0 sinyallerinin oranı ise % 0-9 arasında değişmektedir. Üç hastada ise (1, 9 ve 11 no’lu hastalar) 2/1 sinyallerine yüksek oranda rastlanmıştır (sırasıyla %29, 49 ve 26). Bu hastalarda p16 lokusunun spesifik olarak delesyona uğradığı düşünülmüştür. Hasta no 1 ve 9’de ayrıca 2/0 sinyal paterni gösteren hücrelerin oranı da sırasıyla % 20 ve %16 olarak hesaplanmıştır. Bu da, söz konusu hastalarda monoallelilik kaybın yanısıra önemli ölçüde biallelik p16 kaybının da olduğunu göstermektedir. Hasta no 14’de ise 2/2 sinyal oranının düşük (%24) ve 1/1 sinyal oranının da yüksek (%42) olduğu görülmektedir. Bu durumun 9. kromozom monosomisine bağlı olduğu düşünülmüştür (Tablo 7 ve 8) (Şekil 16).

4.2.2. Retinoblastoma geni:

Retinoblastoma genine özgü tek bir prob kullanılmıştır. Normalde her hücrede izlenmesi gereken sinyal sayısı 2’dir, sinyal sayısında azalma olması spesifik olarak retinoblastoma geninin delesyonuna, ya da 13. kromozomun kaybına bağlı olabilir. Özellikle hasta No 1, 3, 9, 11, ve 12’de eksik sinyalli (yalnızca tek sinyal seçilebilen ya da hiç seçilemiyen) hücre oranının yüksek olduğu görülmektedir; bu hastalarda normal sayıda (yani 2) sinyal seçilebilen hücrelerin oranı sırasıyla %56, 48, 50, 66, ve 56’dır (Tablo 9 ve 10) (Şekil 17).

4.2.3. CDK4 geni

Lokus spesifik prob ile yapılan değerlendirmede hücre içinde 5 ya da üzerinde sinyal sayılması gen amplifikasyonu olarak değerlendirilmiştir (daha önce de belirtildiği gibi mitoz nedeni ile sinyal sayısı 4'e kadar çıkabilir). Ancak bu tanıma göre hiç bir hastada CDK4 gen amplifikasyonu olmadığı görölmüştür (Tablo 11 ve 12) (Şekil 18).



Tablo 7a ve 7b. Onaltıncı kromozom sentromerine ve p16 lokusuna spesifik dual (ikili) prob ile malign melanomlu 10 hastanın biyopsi materyalinden hazırlanan kesitlerin hibridizasyonundan sonra elde edilen sonuçların dökümü. "a/b" ifadesinde "a" sentromerik sinyal sayısını, "b" de p16 geninin bulunduğu 9p21 lokusuna ait sinyal sayısını göstermektedir. Örneğin "2/1" ile gösterilen sütunda, 2 adet sentromerik ve 1 adet de p16 lokusuna ait sinyal tesbit edilen hücrelerin sayısı gösterilmiştir. p16 geni delesyona uğramamışsa bu iki sayının (a ve b) birbirine eşit (ve normalde 2/2) olması beklenir; ancak bazı hücreler mitoz halinde olabildiğinden bu değerler 4'e kadar normal olabilir (yer darlığı nedeni ile 4 ve 3 adet p16 sinyali seçilen hücrelerin dökümü [Tablo 7a] ve 2'den az sinyal seçilebilen hücrelerin dökümü [Tablo 7b] tablo ikiye bölünerek verilmiştir. Üç hastada (hasta no 1, 9 ve 11) 2/1 sinyali sayılan hücrelerin çokluğu dikkati çekmektedir.

Tablo 7a

Hasta	Evre	4 adet p16 sinyali görülen hücre sayısı						3 adet p16 sinyali görülen hücre sayısı					
		0/4	1/4	2/4	3/4	4/4		0/3	1/3	2/3	3/3	4/3	
1	III	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
2	IV	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
3	I	0	0	0	0	0		0	0	0	0	1	0
4	II	0	0	5	0	4		0	0	0	0	0	0
5	II	0	0	0	0	0		0	0	0	4	0	0
7	II	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
9	II	0	0	0	0	1		0	0	0	0	0	0
11	II	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
12	I	0	0	0	0	0		0	0	0	3	4	0
14	III	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0

Tablo 7b

Hasta	Evre	2 adet p16 sinyali görülen hücre sayısı					1 adet p16 sinyali görülen hücre sayısı				0 adet p16 sinyali görülen hücre sayısı				Sayılan hücre			
		0/2	1/2	2/2	3/2	4/2	0/1	1/1	2/1	3/1	4/1	0/0	1/0	2/0		3/0	4/0	
1	III	0	0	9	0	0	0	5	15	1	0	0	4	6	10	1	0	51
2	IV	0	0	35	0	0	0	6	4	0	0	0	2	1	5	0	0	53
3	I	0	0	35	2	0	0	2	5	0	0	0	0	2	2	0	0	49
4	II	0	0	37	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	51
5	II	0	0	61	0	0	0	8	6	0	0	0	0	0	0	0	0	79
7	II	0	0	49	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	52
9	II	0	0	14	0	0	0	0	1	24	0	0	1	0	8	0	0	49
11	II	0	2	23	0	0	0	10	14	0	0	0	1	2	0	0	0	53
12	I	0	4	44	5	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	67
14	III	0	0	8	0	0	0	0	14	3	0	0	4	1	1	0	0	33

Tablo 8a ve b. Tablo 7a ve 7b'deki veriler yüzde (%) olarak gösterilmiştir. "a/b" ifadesinde "a" hücre içinde sayılan sentromerik sinyalleri, "b" de p16 lokusu sinyallerini göstermektedir. Hasta no 1, 9, ve 11'de 2 adet sentromerik sinyale karşılık 1 adet lokus spesifik sinyal saptanan (a/b = 2/1) hücrelerin oranının yüksek olduğu dikkati çekmektedir.

Tablo 8a

Hasta	Evre	4 adet p16 sinyali görülen hücrelerin yüzdesi (%)					3 adet p16 sinyali görülen hücrelerin yüzdesi (%)				
		0/4	1/4	2/4	3/4	4/4	0/3	1/3	2/3	3/3	4/3
1	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
3	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	II	0	0	9	0	9	0	0	0	0	0
5	II	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
7	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	II	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
11	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	I	0	0	0	0	0	0	0	0	4	6
14	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ortalama %		0	0	0.9	0	1.1	0	0	0	0.9	0.8

Tablo 8b

Hasta	Evre	2 adet p16 sinyali görülen hücre yüzdesi (%)					1 adet p16 sinyali görülen hücre yüzdesi (%)				0 adet p16 sinyali görülen hücre yüzdesi (%)				Toplam		
		0/2	1/2	2/2	3/2	4/2	0/1	1/1	2/1	3/1	4/1	0/0	1/0	2/0		3/0	4/0
1	III	0	0	18	0	0	0	10	29	2	0	8	12	20	2	0	100
2	IV	0	0	66	0	0	0	11	8	0	0	4	2	9	0	0	100
3	I	0	0	71	4	0	0	4	10	0	0	0	4	4	0	0	100
4	II	0	0	73	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	100
5	II	0	0	77	0	0	0	10	8	0	0	0	0	0	0	0	100
7	II	0	0	94	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	100
9	II	0	0	28	0	0	0	2	49	0	0	2	0	16	0	0	100
11	II	0	4	43	0	0	0	19	26	0	0	2	4	0	0	0	100
12	I	0	6	66	8	0	0	4	6	0	0	0	0	0	0	0	100
14	III	0	0	24	0	0	0	42	9	0	0	12	9	3	0	0	100
ortalama %		0	1	56	12	0	0	10.2	16	2	0	2.8	3	5.2	2	0	

Tablo 9. Retinoblastoma geninin bulunduğu 13q14 lokusuna spesifik prob ile malign melanomlu 10 hastanın biyopsi materyalinden hazırlanan kesitlerin hibridizasyonun sona erdirilmesi sonrası elde edilen sonuçların dökümü. Her hücrede beklenen sinyal sayısı 2'dir, mitoz nedeni ile 4'e kadar çıkabilir. Beş hastada (1, 3, 9, 11 ve 12) 2'den az sinyal görülebilen hücrelerin yüksek oranda olduğu dikkati çekmektedir.

Hasta no	Evre	Retinoblastoma genine ait sinyal sayısı					Toplam h. sayısı
		4	3	2	1	0	
1	III	0	0	25	17	3	45
2	IV	0	0	48	9	5	62
3	I	0	0	17	16	3	36
4	II	0	7	46	6	0	52
5	II	0	3	65	7	0	75
7	II	0	0	27	3	2	32
9	II	0	0	25	15	10	50
11	II	0	0	33	16	1	50
12	I	0	4	28	18	0	50
14	III	0	0	42	8	0	50

Tablo 10. Retinoblastoma geninin bulunduğu 13q14 lokusuna spesifik prob ile malign melanomlu 10 hastanın biyopsi materyalinden hazırlanan kesitlerin hibridizasyonundan sonra elde edilen sonuçların yüzde (%) olarak dökümü. Her hücrede beklenen sinyal sayısı 2'dir, mitoz nedeni ile 4'e kadar çıkabilir. Beş hastada (1, 3, 9, 11 ve 12) 2'den az sayıda sinyal tesbit edilen hücrelerin yüksek oranda olduğu dikkati çekmektedir.

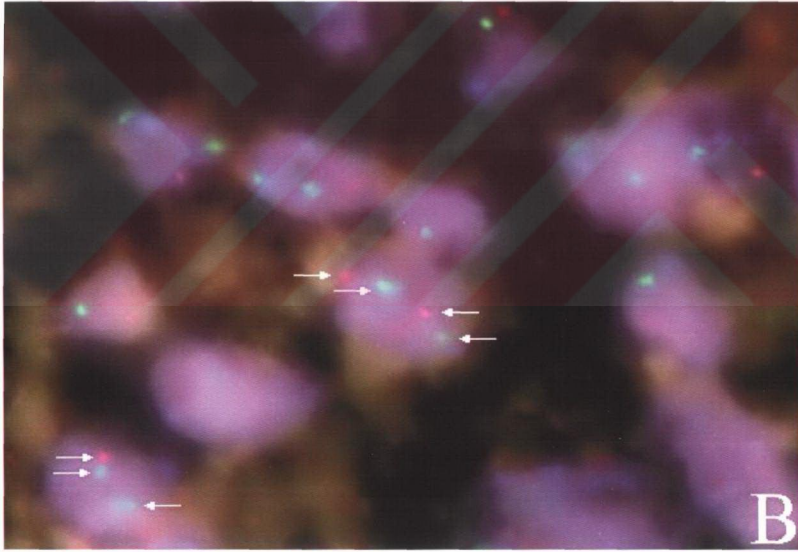
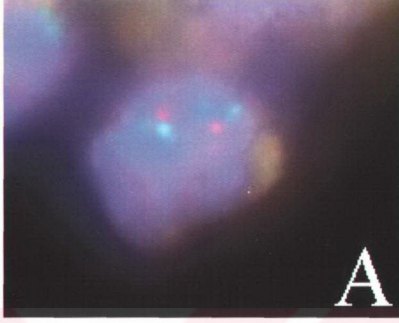
Hasta	Evre	Retinoblastoma genine ait sinyal sayısı					Toplam
		4(%)	3(%)	2(%)	1(%)	0(%)	
1	III	0	0	56	38	6	% 100
2	IV	0	0	77	15	8	% 100
3	I	0	0	48	44	8	% 100
4	II	0	0	88	12	0	% 100
5	II	0	4	87	9	0	% 100
7	II	0	0	85	9	6	% 100
9	II	0	0	50	30	20	% 100
11	II	0	0	66	32	2	% 100
12	I	0	8	56	36	0	% 100
14	III	0	0	84	16	0	% 100
ortalama yüzde		0	1.2	69.5	21.8	26.9	

Tablo 11. CDK4 lokusuna spesifik prob ile malign melanomlu 10 hastanın biyopsi materyalinden hazırlanan kesitlerin hibridizasyonundan sonra elde edilen sonuçların dökümü. Normalde her hücrede beklenen sinyal sayısı 2'dir, mitoz nedeni ile 4'e kadar çıkabilir. Bu değerin üzerindeki (≥ 5) üzerindeki sinyal sayıları amplifikasyon olarak değerlendirilmektedir. Ancak hiçbir hastada ≥ 5 sinyalli hücre tesbit edilememiştir.

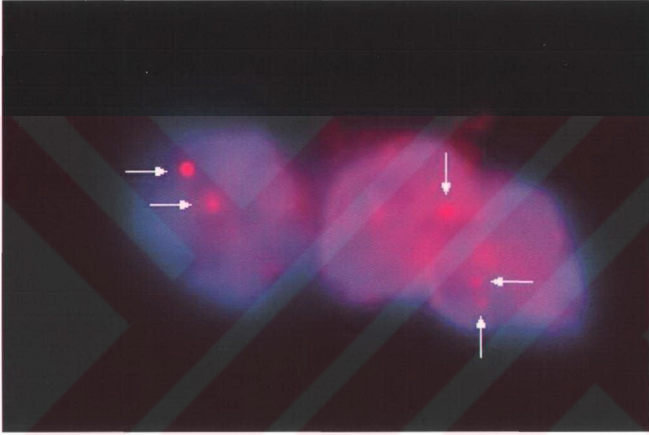
Hasta	Evre	CDK4 genine ait sinyal sayısı						Toplam hücre
		≥ 5	4	3	2	1	0	
1	III	0	2	7	35	5	2	51
2	IV	0	0	2	46	5	0	53
3	I	0	4	0	20	6	0	30
4	II	0	0	15	46	1	0	62
5	II	0	0	13	65	7	0	85
7	II	0	0	0	46	2	2	50
9	II	0	1	15	26	6	2	50
11	II	0	1	9	34	5	7	56
12	I	0	5	21	41	2	0	69
14	III	0	0	2	43	6	1	52

Tablo 12. CDK4 lokusuna spesifik prob ile malign melanomlu 10 hastanın biyopsi materyalinden hazırlanan kesitlerin hibridizasyonundan sonra elde edilen sonuçların yüzde (%) dökümü. Her hücrede beklenen sinyal sayısı 2'dir, mitoz nedeni ile 4'e kadar çıkabilir. Bu değerin üzerindeki (≥ 5) üzerindeki sinyal sayıları amplifikasyon olarak değerlendirilmektedir. Ancak hiçbir hastada ≥ 5 sinyalli hücre tesbit edilememiştir.

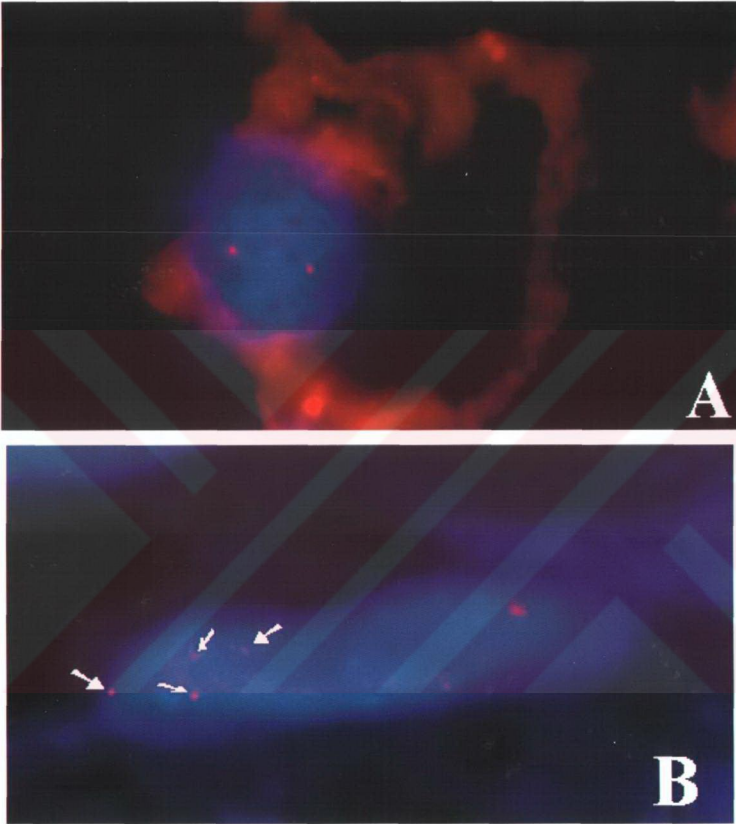
Hasta No	Evre	CDK4 genine ait sinyal sayısı						Toplam
		$\geq 5(\%)$	4(%)	3(%)	2(%)	1(%)	0(%)	
1	III	0	4	14	69	10	4	% 100
2	IV	0	0	4	87	9	0	% 100
3	I	0	0	13	67	20	0	% 100
4	II	0	0	24	74	2	0	% 100
5	II	0	0	15	76	8	0	% 100
7	II	0	0	0	92	4	4	% 100
9	II	0	2	30	52	12	4	% 100
11	II	0	2	16	62	19	13	% 100
12	I	0	7	30	60	3	0	% 100
14	III	0	0	4	83	12	2	% 100
Ortalama yüzde		0	1.3	15	72	9.9	2.7	



Şekil 16 A ve B: İkili (dual) prob ile p16 geninin değerlendirilmesi. Yeşil sinyal sentromere, kırmızı sinyal de p16 lokusuna bağlanan probdan kaynaklanmaktadır. Şekil A'da birbirine yakın durumda iki adet yeşil ve kırmızı sinyal görülmektedir (hasta no 7). Şekil B'de ortadaki hücrede yine ikişer adet yeşil ve kırmızı sinyal görülmektedir. Sol alttaki hücrede iki sentromerik yeşil sinyale karşılık bir adet kırmızı p16 sinyali izlenmektedir (hasta no 1).



ekil 17: Lokus spesifik prob ile Retinoblastoma geninin değerlendirilmesi. Yanyana üç adet hücre örülmektedir. Ortadaki, hücrede tek sinyal izlenmektedir; ancak bu hücre kısmen sağdaki hücre ile üperpozedir (hasta no 7).



Şekil 18 : Lokus spesifik prob ile CDK4 geninin değerlendirilmesi. Şekil 18A'de iki, şekil 18B'de ise soldaki hücrede 4 adet sinyal görülmektedir (sırasıyla hasta no 7 ve 1).

5. TARTIŞMA

5.1. P53 GENİNİN DGGE VE DİZİLEME İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmada, p53 geninin genin tamamı taranmamış, 5-9 eksonlarda mutasyon olup olmadığı incelenmiştir. Ancak, p53 genindeki mutasyonların yaklaşık %90'ının 5-9. eksonlara karşılık gelen “*core domain*” de olduğu bilinmektedir (107). Bu nedenle, yalnızca 5-8 ya da 5-9 eksonların incelenmesinin p53 geninin mutasyonel durumunu yeterince yansıttığı düşünülmektedir (131, 132).

Üç hastada (3, 5 ve 8 no'lu hastalar) DGGE'de seçilebilir bantlar izlenememiştir. Bu durumun formalin içinde fikse edilmiş ve parafinde saklanan biyopsi materyallerinden elde edilen DNA'nın miktarca yetersiz ya da düşük kaliteli oluşu ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Bu üç hastanın değerlendirme dışında bırakılmasına karar verilmiştir. Geriye kalan 12 hastanın hiçbirinde proteinin aminoasit dizilimini değiştiren mutasyon saptanmamıştır. Bu sonuç malign melanomda p53 mutasyonlarının nadir olduğunu bildiren diğer çalışmaların sonuçları ile uyumludur.

Üç hastamızda tesbit etmiş olduğumuz 6. eksondaki A213G mutasyonu aminoasit değişikliğine yol açmamaktadır (sessiz mutasyon). P53 geninin iyi bilinen polimorfizmlerinden biri olan bu mutasyon 1991 yılında tarif edilmiştir. Toplumdaki prevalensi % 11 olarak bildirilmektedir (140). Bizim hasta grubumuzdaki nispeten yüksek oran (3/12; %25) olgu sayımızın düşük olması ya da Türk toplumunun farklı genetik yapısından kaynaklanıyor olabilir.

İmmünohistokimyasal boyama (İHB) yöntemleri ile yapılan ilk çalışmalarda, hücre içi yoğun boyanma paternlerinin, anormal yapılı proteinin yıkımındaki yavaşlamadan kaynaklandığı ve p53 mutasyonunu yansıttığı düşünülmüştür. Bu ilk çalışmaların sonuçları, p53 mutasyonunun malign melanomda da (diğer tümörlerde olduğu gibi) sık olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Primer ve metastatik lezyonlarda, İHB ile %85 oranında anormal protein saptandığı (yani immünoreaktivite bulunduğu) bildirilmiştir (8). Nodüler deri melanomunda, arşiv materyalinde yapılan bir çalışmada, incelenen 30 örneğin 29'unda primer lezyonlarda Pab1801 antikoru ile hücre içinde yüksek p53 ekspresyonu saptanırken, metastazlardaki ekspresyonun primer lezyona göre düşük olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç, p53 anormalliklerinin melanom gelişiminin erken

safhalarında önemli olduğu şeklinde yorumlanmıştır (141). Genel olarak, malign melanomda anormal p53 ekspresyonunun değişik serilerde %20-40 arasında değiştiği bildirilmektedir (142).

Malign melanomda *gen düzeyinde* p53 mutasyonu ilk kez 1991 yılında bildirilmiştir: Volkenandt, melanom hücre soylarında p53 geninin evrimsel olarak iyi korunmuş bölgelerinde p53 mutasyonlarını araştırmış, 9 örneğin *yalnızca birinde* C248T mutasyonu bulabilmiştir. Farelerden elde edilmiş monoklonal antikor 1801 ile yapılan İHB ile de yalnızca bu hücre soyunda immünoreaktivite saptanabilmiştir. Aynı mutasyon, hücre soyunun köken aldığı tümörde de bulunmuştur(143). İHB ve dizileme ile p53 mutasyonunun beraber değerlendirildiği bir başka çalışmada ise, malign melanomda anormal boyanma paternleri sık olmakla birlikte, bunların yalnızca %30'unda *mutant* p53 proteininin söz konusu olduğu bildirilmiştir (9). Albino ve ark., melanom hücre soylarında RNA-SSCP ile p53 mutasyonunun sıklığını %25 olarak bulurken, hiçbir melanom biyopsi örneğinde p53 mutasyonu tespit edememişlerdir (144). Oysaki aynı çalışmada İHB ile artmış p53 ekspresyonu biyopsilerin %42'sinde bulunmuştur.

Beşinci-sekizinci eksonlarda SSCP ile mutasyon taraması ve RFLP analizi (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ile LOH araştırması yapılan bir çalışmada, incelenen hiçbir örnekte ne p53 mutasyonu, ne de p53 geni lokusunda heterozigozite kaybı saptanabilmiştir. SSCP ile mutasyon taraması yapılan diğer çalışmalarda da malin melanomda p53 mutasyon sıklığının %0-20 arasında değiştiği görülmektedir (10, 12, 123, 124).

Bizim çalışmamızda da, SSCP'den daha duyarlı olan ve "GC kıskacı" kullanımıyla sensitivitesi %100'e yaklaşan bir yöntem olan DGGE ile, hiçbir olguda (3 hastadaki A213G sessiz mutasyonu hariç) p53 geninin 5-9. eksonlarında mutasyon bulunamamıştır. Bu sonuç, yukarıda sözü edilen çalışmalarla uyumludur. Bu gözlemler, ilk dönemlerde yapılan İHB çalışmalarının aksine, melanom patogenezinde p53 mutasyonunun önemli bir rolü olmadığını düşündürmektedir. Ancak, p53 geninin etkilenmemiş olmasına rağmen, p53 proteininin içinde yer aldığı sinyal iletim mekanizmalarının aksayabileceği bilinmektedir. Örneğin, Li-Fraumeni sendromu'nun tipik özelliklerini gösteren ve p53 mutasyonu saptanamayan bazı ailelerde, CHK2 geninde mutasyon olduğu gösterilmiştir (120). Bir kinaz olan CHK2 proteini, ultraviyolenin yol açtığı DNA hasarı ile aktive olmakta ve p53'ün amino ucunu fosforilleyerek onun MDM2 ile

etkileşimini engellemektedir. Dolayısı ile p53'ün hücre içi düzeyinin artmasını sağlamaktadır. Muhtemelen aynı sinyal iletim mekanizması içerisinde yer almaları nedeni ile, p53'ün de, CHK2'nin de germline mutasyonları aynı klinik tabloya yol açmaktadır.

Melanomda da benzer bir mekanizma ile p53 aktivitesinin *dolaylı olarak* devre dışı kaldığı düşünülebilir. Bunu destekleyen bir gözlem, malign melanomun kemoterapiye son derece dirençli bir tümör olmasıdır (145). Bilindiği gibi kemoterapi, p53'ün başlattığı apoptosis ile tümör üzerinde etkili olmaktadır (15). Diğer yandan, kemoterapi ve radyoterapiye yanıtızlığın p53 mutasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (146). Malign melanomda ise p53 proteininin normal olmasına rağmen kemorezistans saptanması, apoptotik mekanizmada p53 ile etkileşen başka proteinlerde defekt olabileceğini akla getirmektedir. Son zamanlarda yapılan önemli bir çalışmada, p53 ile ilişkili apoptotik süreçte rol oynayan *Apaf-1* adlı proteinin malign melanomda sıklıkla eksprese olmadığı gösterilmiştir (bakınız: P53 ve apoptosis)(147). İlginç olarak, aynı çalışmada melanom hücre kültürlerinin DNA metilasyonunu baskılayan bir ajan olan *5aza2dC* ile muamele edilmesi Apaf-1 ekspresyonunu tekrar başlatmıştır. Bu da Apaf-1 gen ekspresyonunun, malign melanomda *epigenetik* bir inaktivasyon mekanizması ile (genlerin promoter bölgelerindeki CpG adacıklarının metilasyonu gibi) baskılandığını düşündürmektedir. Bu buluşun bir başka önemi, kuramsal olarak malign melanomlu hastalarda yeni bir tedavi seçeneğinin ortaya çıkmasıdır: metilasyon, DNA düzeyindeki değişikliklerin tersine geriye dönüşümlü bir olay olup *5aza2dC* gibi ajanlarla denenen farmakolojik girişimlere cevaplıdır (148).

Malign melanomda, intakt p53'e rağmen apoptotik süreci aksatan başka mekanizmalar da söz konusu olabilir: *Survivin* adlı proteinin melanomda sıklıkla aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir, bu protein kaspaz-3 ve 7'yi baskılamaktadır (149).

Bu gözlemler, melanomogenezin, genetik yönden diğer kanser türlerine göre daha karmaşık mekanizmalarla geliştiğini düşündürmektedir. Son çalışmalarla toplanan kanıtlar, özellikle apoptotik süreçte hatalar olduğunu, bu hataların çoğu kez p53'ün kendisini etkilemediğini ancak onu işlevsel olarak devre dışı bıraktığını göstermektedir. Bu da, bizim çalışmamızda olduğu gibi, melanomlarda p53 gen mutasyonunun diğer tümörlere göre neden daha nadir görüldüğünü açıklayabilir.

5.2. P16, RETİNOBLASTOMA VE CDK4 GENLERİNİN FISH İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

5.2.1. FISH ile p16 gen delesyonunun değerlendirilmesi

Dual prob ile yapılan FISH incelemesinde üç hastada (hasta no 1, 9 ve 11), değerlendirilen hücrelerin büyük bir bölümünde hemizigot p16 delesyonunu düşündüren sinyal kaybı görülmüştür. Bu hastaların ikisinde (hasta no 1 ve 9) homozigot delesyon varlığını düşündüren hücrelerin de oranı nisbeten yüksektir (sırasıyla %20 ve %16).

Daha önceki çalışmalarda p16 gen delesyonunun değerlendirilmesinde daha çok polimorfik göstergelerin (marker) kullanıldığı moleküler teknikler (LOH analizi) tercih edilmiştir; FISH uygulaması daha nadirdir. Yaptığımız literatür araştırmasına göre p16 genine yönelik olarak malign melanomda FISH uygulaması yoktur. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde yapılan bir çalışmada, 9p21 lokusunun polimorfik göstergelerle değerlendirilmesinin FISH sonuçları ile paralellik gösterdiği bildirilmiştir (151).

Melanomlarda p16 genini içeren LOH sıklıkla saptanmaktadır. Primer deri melanomlarında kromozom 9p21'de LOH sıklığı %24- %71 arasında değişmektedir. (152, 153, 154, 155, 156). Yüksek oranda LOH görülmesine rağmen gen içi mutasyonların seyrek oluşunu kromozom 9p21'de bulunan başka bir tümör süpresör genine bağlayan başka araştırmacılar da vardır (153). Üç hastamızda (bütün hastalarımızın %30'u) hemizigot p16 delesyonunu düşündüren hücrelerin yüksek oranda olması, söz konusu çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir.

P16 ile ilgili ilk çalışmalarda, çeşitli kanser türlerinden köken alan bir çok hücre kültüründe p16 gen delesyonunun sık olduğu görülmüştür (5). Oysaki aynı tarihlerde yapılan araştırmalarda, hem tümör dokusunda p16 gen içi mutasyonlarının seyrek oluşu, hem de homozigot delesyonların gösterilemeyişi, hücre kültürlerindeki p16 kaybının tesadüfi olabileceği şeklinde yorumlanmış ve p16'nın tümör gelişimindeki öneminin sorgulanmasına yol açmıştır. Daha sonra yapılan ayrıntılı mikrosatellit analizlerinde ise p16 geninin, bir çok kanser türünde, daha önce uygulanmakta olan tekniklerle gösterilmesi güç mikrolelesyonlar neticesinde biallelik olarak kaybedildiği anlaşılmıştır (152). Gerçekten de, homozigot delesyonlarının sık, buna

karşılık gen içi mutasyonların nadir oluşu, p16 genini diğer tümör süpresör genlerinden ayıran önemli bir özelliktir (32). Diğer tümör süpresör genlerinde, örneğin p53 geninde daha yaygın olan inaktivasyon mekanizması, bir allelin hemizigot delesyonla kaybı, diğerinde de gen içi mutasyon gelişmesidir (157).

Malign melanomda da p16 gen mutasyonlarının ya hiç olmadığı ya da çok nadir olduğu bildirilmektedir (53, 158, 159). Melanomda homozigot delesyonların sıklığı değişik çalışmalarda % 6-25 olarak bildirilmiştir; bu oran, diğer birçok kanser türünden daha düşüktür. Yine de, başka tümörlerde olduğu gibi, melanomda da p16 geninin esas inaktivasyon şekli biallelik kayıp (başka bir ifade ile homozigot delesyon) olarak gözükmemektedir. Metilasyon nadir olup bir çalışmada primer melanomların %10'unda bulunabilmiştir (32).

Bizim çalışmamızda homozigot p16 delesyonunun nisbeten yüksek olduğu iki hasta mevcuttur (hasta no 1 ve 9). Bu hastalardan birinde (hasta no 1) hastalık evresi III ve diğerinde de (hasta no 9) II olarak belirlenmiştir. Ancak olgu sayısının az olması evre ile ilişkilendirmeyi güçleştirmektedir. Bu iki hastada hemizigot kayıp görülen hücrelerin de oranı oldukça yüksektir; bunlarda tümörün genetik yönden dönüşüm halinde olduğu ve daha ileri evrelerinde biallelik kayıplı hücrelerin baskın hale geçeceği düşünülebilir. Ancak bu iddianın doğrulanabilmesi için hastalığın değişik aşamalarında alınan biyopsi örneklerinde analiz yapılması gereklidir.

Çalışmamız, malign melanomda biallelik p16 kaybının diğer tümörlere kıyasla daha nadir görüldüğünü doğrulamaktadır. Bu da, p53 geninde görülen durumu kısmen andırmaktadır: p53 mutasyonları, çeşitli tümörlerde son derece sıkken melanomda nadirdir. Bu gözlemler, melanomun daha kendine özgü genetik mekanizmalarla geliştiğini desteklemektedir.

Diğer yandan, p16 geninin durumunu değerlendirirken göz önünde tutulması gereken bir başka nokta, p14^{ARF} geninin p16 ile aynı lokusu paylaştığı ve p16 genini ilgilendiren delesyonlarda zorunlu olarak bu genin de kayba uğradığıdır. Bilindiği gibi, p14^{ARF}, MDM2 adlı proteine bağlanmakta ve dolayısı ile p53'ün stabilizasyonunu sağlamaktadır, yani p14^{ARF} ve p53 aynı tümör baskılayıcı mekanizma içindedirler. O halde, p16/p14^{ARF} lokusunun homozigot delesyona uğradığı tümörlerde, p53 aktivitesinin de ortadan kalkacağı düşünülebilir. Böyle bir

tümörde p53 geninin mutasyona uğraması, kanser hücresine daha fazla seçim üstünlüğü sağlamıyacaktır. Gerçekten de, 714 primer tümör ve hücre soyu üzerinde yapılan bir çalışmada, hem p16/p14^{ARF} hem de p53 kaybının yalnızca %7 sıklıkta görüldüğü bildirilmiştir (72). Bu da, en azından homozigot p16 delesyonu görülen melanomlarda p53 mutasyonlarının neden görülmediğini açıklayabilir. Ancak, küçük hücreli olmayan (*non-small cell*) akciğer kanserlerinde p53 mutasyonu saptanan örneklerin %50'sinde p14^{ARF} geninin de (p16 ile birlikte) homozigot delesyona uğradığı saptanmıştır, bu da p14^{ARF} ve p53 kaybının farklı etkileri olduğunu düşündürmektedir (160).

5.2.2. FISH ile retinoblastoma gen delesyonunun değerlendirilmesi

Lokus spesifik prob ile yapılan FISH değerlendirilmesinde, 5 hastada (hasta no 1, 3, 9, 11 ve 12) retinoblastoma geni kopya sayısında azalma saptanan (normalde 2 adet olması gerekirken tek bir sinyal görülebilen ya da hiç sinyal görülemiyen) hücrelerin yüksek oranda olduğu dikkati çekmektedir. Diğer yandan söz konusu 5 hastadan ikisinde hastalık evresi I, bir diğer ikisinde II ve yalnızca birinde III olarak belirlenmiştir. Ancak, olgu sayımızın az ve çoğunun da (7 adet) nispeten erken evrede (I ya da II) olması hastalığın aşaması ile ilişki kurmayı güçleştirmektedir.

Çeşitli tümör tiplerinde retinoblastoma geninin inaktivasyona uğradığı bilinmektedir. Bununla birlikte deri melanomlarında yapılan çalışmalar son derece nadirdir; bir çalışmada retinoblastoma genini ilgilendiren büyük delesyonların seyrek olduğu bildirilmiştir (161). Ayrıca, bir başka çalışmada immünohistokimyasal boyama ile retinoblastoma gen ekspresyonunun kaybolmadığı, hatta benign nevüslere göre daha artmış olduğu görülmüştür (162). Ancak, melanom gelişiminde retinoblastoma gen kaybının önemsiz olduğunu iddia etmek kolay değildir: ailevi retinoblastomada, deri melanomuna da yatkınlık olduğu bilinmektedir (14).

Deri melanomunda retinoblastoma geninin FISH ile değerlendirildiği bir çalışma henüz yoktur. Sonuçlarımızın değerlendirilmesini güçleştiren bir faktör, çalışmamızda yalnızca lokus spesifik bir prob kullanabilmiş olmamızdır. Bu nedenle 5 hastada izlenen sinyal kaybının 13. kromozomun tümüyle delesyonuna mı, yoksa retinoblastoma geninin bulunduğu 13q14 delesyonuna mı bağlı olduğunu kesinlikle söylemek mümkün değildir. Solid tümörlerde sayısal kromozom anomalileri sıktır: meme, böbrek, over, akciğer ve baş-boyun kanserleri ve malign

melanomda yapılan büyük bir sitogenetik çalışmada, aralarında 13. kromozomun da bulunduğu bir çok kromozomun kayba uğradığı saptanmıştır (163). Bu nedenle, bulgularımızın 13. kromozom kaybına bağlı olması da mümkündür. Yine de, p16 ve retinoblastoma proteinlerinin aynı tümör süpresyon yolu üzerinde olması nedeniyle, teorik olarak, p16 kaybı gibi retinoblastoma gen kaybının da (spesifik olarak 13q14 lokusunun delesyonu ya da 13. kromozomun kaybı şeklinde) melanomlarda görülmesi beklenebilir. Ancak günümüzde konuyla ilgili olarak yapılmış çalışmaların sayısı azdır ve malign melanomda spesifik olarak retinoblastoma geninin değerlendirilmesinde ikili proble ve daha çok hasta üzerinde araştırma yapılmasına gerek vardır.

Bu çalışmada gerek p16, gerekse retinoblastoma genleri FISH ile interfazda değerlendirilmiştir. O nedenle bu genlerin bütünlüğünü bozabilecek translokasyonlar söz konusu yöntemle saptanamayabilir. Ancak yukarıda sözü edilen diğer çalışmalardan da anlaşılabileceği üzere p16 başlıca olarak homozigot delesyon, retinoblastoma ise heterozigozite kaybı ile inaktive olmaktadır (5, 16, 19, 100). O nedenle interfazda FISH uygulamasının bu genlerin delesyon durumu hakkında yeterli veri sağlayacağı düşünülmüştür.

5.2.3. FISH ile CDK4 gen amplifikasyonunun değerlendirilmesi

Lokus spesifik prob ile yaptığımız FISH değerlendirmesinde hiçbir hastada CDK4 onkogen amplifikasyonunu düşündürecek sinyal artışı saptanmamıştır.

CDK4'ün malign melanom gelişiminde önemli rol oynayabileceğini düşündüren başlıca unsurlar, 1°CDK4'ün hücre siklusunun sürdürülmesini sağlayan siklin bağımlı kinazlardan biri olması, 2° p16'nın CDK4'ü baskılayarak hücre siklusunu yavaşlatması; 3° Osteosarkom, meme kanseri ve glioblastoma multiforme gibi tümörlerde CDK4 geninin amplifikasyona uğraması, 4° Ailevi melanomların bazılarında CDK4'ü p16'ya yanıtız hale getiren germline mutasyonların saptanmış olmasıdır (5, 83, 84, 85, 86). Gen amplifikasyonunun görüldüğü tümörlerde, IHB ile CDK4 ekspresyonunun arttığı da saptanabilmektedir (83, 84). Ancak, moleküler düzeyde yapılan çalışmalar, melanomda CDK4 gen amplifikasyonunun çok nadir olduğunu göstermiştir (22, 88).

Diğer yandan, gerek protein düzeyinde yapılan immünohistokimyasal incelemeler, gerekse tümörde mRNA düzeyinin değerlendirilmesine yönelik araştırmalar, malign melanomda CDK4 ekspresyonunun arttığını göstermektedir (22, 87). Bu da gen düzeyinde bir değişiklik saptanmasa da artmış CDK4 aktivitesinin melanom patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu artmış aktivitenin dolaylı mekanizmalarla ortaya çıkabileceği de göz önünde tutulmalıdır: CDK4, ya da hücre siklusunda rol oynayan diğer siklin bağımlı kinazlar, *siklin* adlı alt birimlere bağlanarak etki göstermektedirler. D tipi siklinler (D1, D2, D3 olarak 3 alt tipi vardır), özellikle hücre siklusunun G1 fazında artmakta ve CDK4 ve CDK6 ile etkileşmektedirler. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, malign melanomun bir alt tipi olan akril melanomda siklin D1 amplifikasyonunun sıklığı %44 olarak bildirilmiştir. Bu da, siklin D1'in malign melanom patogenezinde önemli bir onkogen olabileceği şeklinde yorumlanmıştır(164).

Sonuçlarımız, malign melanomda CDK4 amplifikasyonunun önemli olmadığını bildiren yukarıdaki çalışmaların sonuçları ile uyumludur. Ancak yalnızca FISH çalışmasına dayanarak CDK4 aktivitesinin melanom oluşumundaki rolü hakkında karar vermek kolay değildir, çalışmamızda yapılamamış olsa da IHB ile ekspresyon değerlendirmesi bu yönden yararlı olabilir. Ayrıca, CDK4'ün etkileşim halinde olduğu siklin D1'in de gerek gen, gerek ekspresyon düzeyinde incelenmesi melanom patogenezinin ışık tutabilir.

6. SONUÇ VE ÖZET

P53 tümör süpresör geninin DGGE ve dizileme ile incelenmesi neticesinde, değerlendirme yapılabilen 12 hastanın hiçbirinde p53 proteininin amino asit dizilimini etkileyen mutasyon bulunamamıştır. Yalnızca üç hastada (hasta no 2, 6 ve 13) 6. eksonda, 213. kodonda CGA→CGG nokta mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyon p53 geninin bilinen polimorfizmlerinden biri olup 213. kodonun kodladığı arginin aminoasidi değişmeden kalmaktadır (sessiz mutasyon).

Sonuçlarımız p53 mutasyonlarının malign melanomda nadir olduğunu bildiren diğer çalışmalarla uyumludur. Ancak bu durum, p53'ün içinde yer aldığı ve DNA hasarının algılanmasından başlayıp hücre siklusunun duraklatılması ya da apoptosisle sonuçlanabilen sinyal iletim mekanizmasının malign melanomda “sağlam” olduğu şeklinde yorumlanmamalıdır. Aynı mekanizma içinde yer alan başka genlerin de araştırılması bu konuya ışık tutabilir: son zamanlarda p53 ile ilişkili apoptotik süreçte yer alan Apaf-1 geninin malign melanomda delesyona uğradığı gösterilmiştir.

FISH uygulaması, 2 hastada patolojik incelemede yeterli tümör dokusu saptanamaması, 3 hastada da hibridizasyon sağlanamaması nedeni ile 10 hastada gerçekleştirilebilmiştir.

P16 geninin dual prob kullanarak FISH ile değerlendirmesinde üç hastada (hasta no 1, 9 ve 11), hücrelerin önemli bir bölümünde hemizigot p16 delesyonunu düşündüren sinyal kaybı görülmüştür (sırasıyla hücrelerin %29, 49 ve 26'sında). Bu üç hastadan ikisinde (hasta no 1 ve 9) homozigot delesyon düşündüren hücrelerin oranı nispeten yüksektir (sırasıyla %20 ve % 16). Hastalık evrelemesi I no'lu hastada da III ve 9 no'lu hastada II olarak belirlenmiştir, ancak olgu sayısının azlığı evre ile ilişkilendirmeyi güçleştirmektedir.

P16, malign melanomda değişikliğe uğradığı gösterilen ilk gen olmasına rağmen, malign melanomda diğer tümörlere göre daha az etkilenebilmektedir. Daha çok homozigot delesyona uğramaktadır ve değişik çalışmalarda % 6-25 arasında değişen oranlarda homozigot delesyon saptanmaktadır. Bulgularımızın bu çalışmalarla uyumlu olduğunu düşünüyoruz. P16 geninin

diğer tümörlere göre daha az oranda etkilenmiş olması malign melanomun (p53'de olduğu gibi) farklı genetik mekanizmalarla geliştiğini doğrulamaktadır.

Retinoblastoma tümör süpresör geninin lokus spesifik prob ile yapılan değerlendirmesinde ise 5 hastada (hasta no 1, 3, 9, 11 ve 12'de) genin normalde iki olması gereken kopya sayısında azalma (tek ya da 0 kopya sayılı) olan hücre oranının yüksek olduğu görülmüştür, bu hastalarda genin normal sayıda (yani 2 adet) izlenebildiği hücrelerin oranı (sırasıyla) %56, 48, 50, 66 ve 56'dır. Ancak yalnızca lokus spesifik prob kullanabilmiş olmamız sonuçlarımızı değerlendirmeyi güçleştirmektedir. Saptanan gen kaybı, 13. kromozomun tümüyle kaybına bağlı olabileceği gibi, genin spesifik olarak delesyonuna da bağlı olabilir. Malign melanomda retinoblastoma geninin değerlendirildiği bir çalışmada gen delesyonunun nadir olduğu bildirilmiştir. Diğer yandan söz konusu 5 hastadan ikisinde hastalık evresi I, bir diğer ikisinde II ve yalnızca birinde III olarak belirlenmiştir. Ancak, olgu sayımızın az ve çoğunun da (7 adet) nispeten erken evrede (I ya da II) olması hastalığın aşaması ile ilişki kurmayı güçleştirmektedir. Konuya açıklık getirmek için daha çok hasta üzerinde ve ikili prob ile çalışmalar yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

Lokus spesifik prob ile hiçbir hastada CDK4 geninde amplifikasyon saptanmamıştır. Bu sonuç, malign melanomda CDK4 gen amplifikasyonunun nadir olduğunu bildiren diğer çalışmalarla uyumludur. Ancak, malign melanomda CDK4 ekspresyonunun arttığı bilinmektedir. Hücre siklusu içinde CDK4 ile etkileşim halinde başka onkogenlerin de (siklin D1 gibi) patogeneizde rolü olabilir.

Parafin bloklarda saklanan arşiv materyalinde FISH uygulaması teknik güçlükleri nedeniyle taze dokuya göre daha nadir olarak uygulanmaktadır. Ancak eldeki hazır materyelde retrospektif çalışma yapma olanağı da vermektedir Bu çalışmada elde edilen tecrübeye göre, kullanılan ön işlem (pretreatment) uygulaması, makul kalitede hibridizasyon sağlamaktadır. Aynı uygulamanın başka tümörlerde de retrospektif çalışmalar için uygun olduğunu düşünüyoruz.

7. CONCLUSION AND SUMMARY

Evaluation of the p53 gene by DGGE and sequencing showed that none of the patients had a mutation which affected the aminoacid sequence of the p53 protein. Only three patients (patient no 2, 6 and 13) had a silent point mutation (A213G) in exon 6. This is one of the well-known polymorphisms of the p53 gene which does not alter the aminoacid (arginin) encoded by codon 213.

Our results confirm other studies reporting that p53 gene mutations are rare in melanoma. However, this finding does not imply that the p53 pathway beginning with the recognition of DNA damage and ending with either cell cycle arrest or apoptosis is intact. Evaluation of the other genes which participate in the same pathway may shed more light on this issue: recently, it has been shown that Apaf-1 gene, which is involved in p53- related apoptosis, is deleted in melanoma.

FISH could be performed in 10 patients because of the insufficient amount of tumor tissue in two patients and low quality of hybridization in 3 patients.

Examination of the p16 gene with a dual color probe showed that in three patients (patient no 1, 9 and 11), the percentage of cells with a signal pattern suggesting hemizygous deletion was considerably high. In two of these patients (patients no 1 and 9) the percentage of cells with a signal pattern suggesting homozygous deletion was also relatively high (20% and 16%, respectively). In these patients, staging of the disease was III (patient no 1) and II (patient no 9). However, small sample size of the study makes it difficult to establish a correlation between stage and p16 status. It has been reported that p16 is inactivated mainly by homozygous deletion in most tumors and that in malignant melanoma, the frequency of homozygous deletion is % 6-25. As is the case with p53, p16 is inactivated to a lesser extent in melanoma compared to other cancers, implying that melanoma has its different pathogenetic mechanisms.

Evaluation of the deletion status of the retinoblastoma gene with a locus specific probe revealed that in 5 patients (patient no1, 3, 9, 11 and 12), the percentage of cells with one or two copies of the gene missing were considerably high; in these patients, the percentage of the cells

with two copies of the gene were only %56, %48, %50, %66, and %56, respectively. However, since we could use only a locus specific probe, it is difficult to interpret this finding: the observed copy loss may be both due to a specific deletion of the gene or loss of the whole chromosome 13. It has been reported that deletion of the retinoblastoma gene is rare in melanoma although relevant studies are rare. Again, it is difficult to establish a correlation between disease stage and retinoblastoma gene status due to the small sample size of the study. Studies with more patients and with dual-color probes are needed to clarify the importance of retinoblastoma gene loss in melanoma.

In none of the tumor samples we were able to find amplification of the CDK4 gene with a locus specific probe. Our results also confirm that CDK4 gene amplification is rare in melanoma. However, it has been reported that CDK4 gene expression is increased in melanoma. It may be suggested that other oncogenes interacting with CDK4 (like cyclin D1) may have a role in melanomogenesis.

Compared to fresh tissue, FISH is applied less frequently on archival biopsy material kept in paraffin blocks due to technical difficulties. However, it offers the advantage of performing retrospective studies on already available archival material. The experience gained in this study showed that the pretreatment procedure used yielded hybridizations with a reasonable quality, suggesting that the same techniques may be applied also in other tumors.

8. KAYNAKLAR

1. Chin L, Merlino G, DePinho RA. Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. *Genes and Dev* 1998 12:3467-3481.
2. Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Dermatol* 2000, 25:459-463.
3. Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, Hegi ME, Wiseman RW, Petty EM, Bale AE, et al. Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science* 1992; 1992 258:1148-52.
4. Cowan JM, Halaban R, Francke U. Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80:1159-64.
5. Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001; 264:42-55.
6. Borg A, Sandberg T, Nilsson K, Johannsson O, Klinker M, Masback A, Westerdahl J, Olsson H, Ingvar C. High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1260-6.
7. On Line Mendelian Inheritance in Man(<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>): TUMOR PROTEIN p53; TP53 (191170), 2002.
8. Stretch JR, Gatter KC, Ralfkiaer E, Lane DP, Harris AL. Expression of mutant p53 in melanoma. *Cancer Res* 1991; 51:5976-9.
9. Weiss J, Scwechheimer K, Cavenee WK, Herlyn M, Arden KC. Mutation and expression of the p53 gene in malignant melanoma cell lines. *Int J Cancer* 1993; 54:693-9.
10. Castresena JS, Rubio MP, Vazquez JJ, Idoate M, Sober AJ, Seizinger BR, Barnhill RL. Lack of allelic deletion and point mutation as mechanisms of p53 inactivation in human malignant melanoma. *Int J Cancer* 1993; 55:562-5.
11. Montano X, Shamser M, Whitehead P, Dawson K, Newton J. Analysis of p53 in human cutaneous melanoma cell lines. *Oncogene* 1994; 9: 1455-9.
12. Lubbe J, Reichel M, Burg G, Kleihues P. Absence of p53 gene mutations in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 1994; 102:819-21.
13. Alonso J, Garcia-Miguel P, Abelairas J, Mendiola M, Sarret E, Vendrell MT, Navajas A, Pestana A. Spectrum of germline RB1 gene mutations in Spanish retinoblastoma patients: Phenotypic and molecular epidemiological implications. *Hum Mutat* 2001; 17:412-22.

14. Newsham IF, Hadjistilianu T, Cavenee WK, Vogelstein B, Kinzler KW (editörler). Retinoblastoma. Birinci baskı, New York: McGraw-Hill, 363-392, 1998.
15. Markaki EA, Tsopanomichalou M, Dimitriou H, Stiakaki E, Perdikoyanni C, Spandidos D, Kalmanti M. Mutations of retinoblastoma gene (Rb-1) as a prognostic factor in children with acute leukemia and neuroblastoma. *Pediatr Hematol Oncol* 2001; 18:101-10.
16. Lazaridou A, Miraxtsi C, Korantzis J, Eleftheriadis N, Christakis JI. Simultaneous detection of BCL-2 protein, trisomy 12, retinoblastoma and P53 monoallelic gene deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization (FISH): relation to disease status. *Leuk Lymphoma* 2000; 36:503-12.
17. Gouyer V, Gazzeri S, Bolon I, Drevet C, Brambilla C, Brambilla E. Mechanism of retinoblastoma gene inactivation in the spectrum of neuroendocrine lung tumors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18:188-96.
18. Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M, Buttitta F, Pellegrini S, Gaeta P, La Rocca R, Merlo G, Chella A, Angeletti CA, Dalla Palma P, Bevilacqua G. Cyclin D1 and retinoblastoma susceptibility gene alterations in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998; 75:187-92.
19. Ashida K, Kishimoto Y, Nakamoto K, Wada K, Shiota G, Hirooka Y, Kamisaki Y, Itoh T, Kawasaki H. Loss of heterozygosity of the retinoblastoma gene in liver cirrhosis accompanying hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123:489-95.
20. Lewis DC, Warren N, Shukla VK, Grimshaw D, Laidler P, Padua RA. Gross rearrangements and deletions of the retinoblastoma gene are rare in malignant melanoma. *Acta Derm Venereol* 1993; 73:236.
21. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 1996; 12:97-9.
22. Maelandsmo GM, Florenes VA, Hovig E, Oyjord T, Engebraaten O, Holm R, Borresen AL, Fodstad O. Involvement of the pRb/p16/cdk4/cyclin D1 pathway in the tumorigenesis of sporadic malignant melanomas. *Br J Cancer* 1996; 73:909-16.
23. Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, Maniatis T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucl Acids Res* 1985; 13:3131-3145.
24. Dennis LK. Increasing risk of melanoma with increasing age. *JAMA*, 282:1037-8, 1999.

25. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M: The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 1999; 340: 1341-8.
26. Glass AG, Hoover RN. The emerging epidemic of melanoma and squamous skin cancer. *JAMA* 1989; 262: 2097-2100.
27. Rigel DS, Friedman RJ, Kopf AW. Lifetime risk development of skin cancer in the U.S. population: Current estimates is now 1 in 5. *J Am Acad Dermatol* 1996; 35:1012-3.
28. Evans RD, Kopf AW, Lew RA. Risk factors for the development of malignant melanoma - I. Review of case control studies. *J Dermatol Surg Oncol* 1988; 14: 393-406.
29. Tucker MA, Halpern EA, Hartge HP, Elder DE, Sagebiel RW, Guerry D IV, Clark WH. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *J Am Med Assoc* 1997; 277:1439-44.
30. Wei Q, Matanoski GM, Farmer ER, Hedayati MA, Grosman I. DNA repair and aging in basal cell carcinoma: a molecular epidemiological study. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:1614-8.
31. Elwood M, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer* 1997; 73: 198-203.
32. Mack TM, Floderus B. Malignant melanoma risk by nativity, place of residence by diagnosis, and age at migration. *Cancer Causes Control* 1991; 2:401-11.
33. MacLennan R, Green AC, McLeod GRC, Martin NG. Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1427-32.
34. Holman CDJ, Armstrong BK, Heenan PJ. Relationship of cutaneous malignant melanoma to individual sunlight-exposure habits. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76: 403-14.
35. Bentham G, Aase. Incidence of malignant melanoma of the skin in Norway, 1955-1989: associations with solar ultraviolet radiation, income and holidays abroad. *Int J Epidemiol* 1996 ; 25:1132-8.
36. Gallagher RP, Ma B, McLean DI, Yang CP, Ho V, Carruthers JA, Warshawski LM. Trends in basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and melanoma of the skin from 1973 through 1987. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23:413-21.
37. Preston DS, Stern RS. Nonmelanoma cancers of the skin. *N Engl J Med* 1992; 237:1649-62.
38. Ak I, Stokkel MPM, Bergman W, Pauwels EKJ. Cutaneous malignant melanoma: clinical aspects, imaging modalities and treatment. *Eur J Nucl Med* 2000; 27:447-58.

39. Breslow A. Tumor thickness in evaluating prognosis of cutaneous melanoma (letter). *Ann Surg* 1978; 187:440.
40. Lukowsky A, Bellmann B, Ringk A, Winter H, Audring H, Fenske S, Sterry W. Detection of melanoma micrometastases in the sentinel lymph node and in nonsentinel nodes by tyrosinase polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 1999; 113:554-9.
41. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, et al. Prognostic Factor analysis of 176000 melanoma patients: validation of the American Joint Committee of Cancer Melanoma Staging System. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3622-34.
42. Masback A, Olsson H, Westerdahl J, Ingvar C, Jonsson N. Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population-based study and review. *Melanoma Res* 2001; 11:435-45.
43. Arthur JS, Howard K. Melanoma and other pigmented skin lesions. Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD (editörler). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12. Baskı. New York: McGraw-Hill, 1634-8, 1991.
44. Ho RC. Medical management of stage IV malignant melanoma. Medical issues (review). *Cancer* 1995; 75:735-41.
45. Lynch HT, Fritchot BC, Lynch JF. Familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *J Med Genet* 1978; 15:352-7.
46. Clark WH, Reimer RR, Greene M, Answorth AM, Masrangelo MJ. Origin of familial malignant melanoma from heritable melanocytic lesions: the BK mole syndrome. *Arch Dermatol* 1978; 114:732-8.
47. Bataille V. Genetics of familial and sporadic melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25:464-70.
48. Kacker RK, Giovanella BC, Pathak S. Consistent karyotypic abnormalities in human malignant melanomas. *Anticancer Res* 1990; 10:859-71.
49. Fountain JW, Karayiorgou M, Ernstoff MS, Kirkwood JM, Vlock DR, Titus-Ernstoff L, Bouchard B, Vijayasaradhi S, Houghton AN, Lahti J, et al. Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:10557-61.
50. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH Jr, Tucker MA, Dracopoli NC. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature Genet* 1994; 10:351-3.

51. Matsumura Y, Nishigori C, Yagi T, Imamura S, Takebe H. Mutations of p16 and p15 tumor suppressor genes and replication errors contribute independently to the pathogenesis of sporadic malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* 1998; 290:175-80.
52. Wagner SN, Wagner C, Briedigkeit L, Goos M. Homozygous deletion of the p16INK4a and the p15INK4b tumour suppressor genes in a subset of human sporadic cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 1998; 138:13-21.
53. Ohta M, Berd D, Shimizu M, Nagai H, Cotticelli M-G, Mastrangelo M, Shields JA, Shields CL, Croce CM, Huebner K. Deletion mapping of chromosome region 9p21-p22 surrounding the CDKN2 locus in melanoma. *Int J Cancer* 1996; 65:762-7.
54. MacKie RM, Andrew N, Lanyon WG, Connor JM. CDKN2A germline mutations in U.K. patients with familial melanoma and multiple primary melanomas. *J Invest Dermatol* 1998; 111:269-72.
55. FitzGerald MG, Harkin DP, Silva-Arrieta S, MacDonald DJ, Lucchina LC, Unsal H, O'Neill E, Koh J, Finkelstein DM, Isselbacher KJ, Sober AJ, Haber DA. Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: analysis of a clinic-based population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:8541-5.
56. Kamb A, Herlyn M. Malignant melanoma. Vogelstein B, Kinzler KW (editörler). *The Genetic Basis of Cancer*. Birinci baskı, New York: McGraw-Hill, 507-518, 1998.
57. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple humancancers. *Nature* 1994; 368:753-6.
58. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264:436-40.
59. Spruck CH 3rd, Gonzalez-Zulueta M, Shibata A, Simoneau AR, Lin MF, Gonzales F, Tsai YC, Jones PA. p16 gene in uncultured tumours. *Nature* 1994; 370:183-4.
60. Mori T, Miura K, Aoki T, Nishihira T, Mori S, Nakamura Y. Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I (multiple tumorsuppressor/cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54:3396-7.
61. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994; 8:27-32.

62. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman ML, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:9700-4.
63. Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 1991; 48:880-8.
64. Gonzalgo ML, Bender CM, You EH, Glendening JM, Flores JF, Walker GJ, Hayward NK, Jones PA, Fountain JW. Low frequency of p16/CDKN2A methylation in sporadic melanoma: comparative approaches for methylation analysis of primary tumors. *Cancer Res* 1997; 57:5336-47.
65. Liu L, Lassam NJ, Slingerland JM, Bailey D, Cole D, Jenkins R, Hogg D. Germline p16INK4A mutation and protein dysfunction in a family with inherited melanoma. *Oncogene* 1995; 11:405-12.
66. Goldstein AM, Fraser MC, Struwing JP, Hussussian CJ, Ranade K, Zametkin DP, Fontaine LS, Organic SM, Dracopoli NC, Clark WH Jr, et al. Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations. *N Engl J Med* 1995; 333:970-4.
67. MacGeoch C, Bishop JA, Bataille V, Bishop DT, Frischauf AM, Meloni R, Cuzick J, Pinney E, Spurr NK. Genetic heterogeneity in familial malignant melanoma. *Hum Mol Genet* 1994; 3:2195-200.
68. Goldstein AM, Chidambaram A, Halpern A, Holly EA, Guerry IV D, Sagebiel R, Elder DE, Tucker MA. Rarity of CDK4 germline mutations in familial melanoma. *Melanoma Res* 2002; 12:51-5.
69. Liu L, Goldstein AM, Tucker MA, Brill H, Gruis NA, Hogg D, Lassam NJ. Affected members of melanoma prone families with linkage to 9p21 but lacking mutations in CDKN2A do not harbor mutations in the coding regions of either CDKN2B or p19ARF. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 19:52-4.
70. Stone S, Dayananth P, Jiang P, Weaver-Feldhaus JM, Tavtigian SV, Cannon-Albright L, Kamb A. Genomic structure, expression and mutational analysis of the P15 (MTS2) gene. *Oncogene* 1995; 11:987-91.
71. Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb A. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res*, 1995; 55:2988-94.

72. Sharpless NE, DePinho R. The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9:22-30.
73. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995; 83:993-1000.
74. Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 AND Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8292-7.
75. Quelle DE, Cheng M, Ashmun RA, Sherr CJ. Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16INK4a but not by the alternative reading frame protein p19ARF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:669-73.
76. Palmero I, Pantoja C, Serrano M. P19ARF links the tumor suppressor p53 to Ras. *Nature* 1998; 395:125-126.
77. de Stanchina E, McCurrach ME, Zindy F, Shieh SY, Ferbeyre G, Samuelson AV, Prives C, Roussel MF, Sherr CJ, Lowe SW. E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 1998; 12:2434-42.
78. Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 1998; 12:2424-33.
79. Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 1998; 17:5001-14.
80. Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996; 85:27-37.
81. Gardie B, Cayuela JM, Martini S, Sigaux F. Genomic alterations of the p19ARF encoding exons in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998; 91:1016-20.
82. Fargnoli MC, Chimenti S, Keller G, Soyer HP, Dal Pozzo V, Hofler H, Peris K. CDKN2a/p16INK4a mutations and lack of p19ARF involvement in familial melanoma kindreds. *J Invest Dermatol* 1998; 111:1202-6.
83. Wunder JS, Eppert K, Burrow SR, Gokgoz N, Bell RS, Andrulis IL, Gogko N. Co-

- amplification and overexpression of CDK4, SAS and MDM2 occurs frequently in human parosteal osteosarcomas. *Oncogene* 1999; 18:783-8.
84. An HX, Beckmann MW, Reifenger G, Bender HG, Niederacher D. Gene amplification and overexpression of CDK4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation. *Am J Pathol* 1999; 154:113-8.
 85. Ladanyi M, Lewis R, Jhanwar SC, Gerald W, Huvos AG, Healey JH. MDM2 and CDK4 gene amplification in Ewing's sarcoma. *J Pathol* 1995; 175:211-7.
 86. Reifenger G, Reifenger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res* 1994; 54:4299-303.
 87. Wang YL, Uhara H, Yamazaki Y, Nikaido T, Saida T. Immunohistochemical detection of CDK4 and p16INK4 proteins in cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 1996; 134:269-75.
 88. Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Lin AH, Markl ID, Fountain JW. Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 22:157-63.
 89. Coupland SE, Bechrakis N, Schuler A, Anagnostopoulos I, Hummel M, Bornfeld N, Stein H. Expression patterns of cyclin D1 and related proteins regulating G1-S phase transition in uveal melanoma and retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 1998; 82:961-70.
 90. Udart M, Utikal J, Krahn GM, Peter RU. Chromosome 7 aneusomy. A marker for metastatic melanoma? Expression of the epidermal growth factor receptor gene and chromosome 7 aneusomy in nevi, primary malignant melanomas and metastases. *Neoplasia* 2001; 3:245-54.
 91. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-6.
 92. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PLM, Wang S et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nature Genet* 1997; 16: 64-7.
 93. Greene SL, Thomas JR 3rd, Doyle JA. Cowden's disease with associated malignant melanoma. *Int J Dermatol* 1984; 1984 23:466-7.

94. Knudson AGJR. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68:820-3.
95. Turleau, C, De Grouchy U, Chavin-Coi IN F, Junien C, Seger J, Schieinger P, Leblanc A, Haye C. Cytogenetic forms of retinoblastoma. Their incidence in a survey of 66 patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 16:321-34.
96. Sparkes RS, Murphree AL, Lingua RW, Sparkes MC, Field LL, Funderburk SJ, Benedict WF. Gene for hereditary retinoblastoma assigned to human chromosome 13 by linkage to esterase D. *Science* 1983; 219:971-3.
97. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; 323:643-6.
98. Cavenee WK, Hansen MF, Nordenskjold M, Kock E, Maumenee I, Squire JA, Phillips RA, Gallie BL. Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. *Science* 1985; 228:501-3.
99. Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 1983; 305:779-84.
100. On Line Mendelian Inheritance in Man (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>): RETINOBLASTOMA; RB1 (180200); 2002.
101. Chetty R, Subramoney T, Singh JP. Retinoblastoma and p53 protein expression in sporadic colorectal cancers. *Eur J Surg Oncol* 1998 ; 24:436-9.
102. Susini T, Massi D, Paglierani M, Masciullo V, Scambia G, Giordano A, Amunni G, Massi G, Taddei GL. Expression of the retinoblastoma-related gene Rb2/p130 is downregulated in atypical endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2001; 32:360-7.
103. Korkolopoulou PA, Angelopoulou MK, Kontopidou FN, Patsouris EV, Christodoulou PN, Kittas CN, Davaris P, Pangalis GA. Retinoblastoma gene product and P21 (WAF1, CIP1) protein expression in non Hodgkin's lymphomas: a multivariate survival analysis. *Leuk Lymphoma* 2001; 40:647-58.
104. Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, Taffurelli M, Gamberini M, Pileri SA, Marrano D. Retinoblastoma (RB1) gene product expression in breast carcinoma. Correlation with Ki-67 growth fraction and biopathological profile. *J Clin Pathol* 1998; 51:818-24.

105. Scholes AG, Liloglou T, Maloney P, Hagan S, Nunn J, Hiscott P, Damato BE, Grierson I, Field JK. Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 9, 13, and 17, including the retinoblastoma locus, in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:2472-7.
106. Malkin D. The Li-Fraumeni Syndrome. Vogelstein B, Kinzler KW (editörler). *The Genetic Basis of Cancer*. Birinci baskı, New York: McGraw-Hill, 393-407, 1998.
107. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323-331.
108. Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Gene Dev* 1998; 12:2973-2983.
109. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13:332-337.
110. Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998; 281:1677-9.
111. Linke SP, Clarkin KC, DiLeonardo A, Tsou A, Wahl GM. A reversible, p53-dependent G0/G1 cell-cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev* 1996; 10:934-947.
112. Dreyfus DH, Nagasawa M, Kelleher CA, Gelfand EW. Stable expression of Epstein-Barr virus BZLF-1-encoded ZEBRA protein activates p53-dependent transcription in human Jurkat T-lymphoblastoid cells. *Blood* 2000; 96:625-34.
113. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu PE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Merceur WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75:817-25.
114. Chin PL, Momand J, Pfeifer GP. In vivo evidence for binding of p53 to consensus binding sites in the p21 and GADD45 genes in response to ionizing radiation. *Oncogene* 1997; 15:87-99.
115. Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and cancer. *The Genetic Basis of Human Cancer*. Vogelstein B, Kinzler KW (editörler). McGraw-Hill, New York. Birinci baskı, 193-204, 1998.
116. Zörnig M, Hueber A-O, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; 1551: F1-F37.

117. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329:1318-27.
118. Ozturk M. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 1991; 338:1356-9.
119. Li FP, Fraumeni Jf Jr. Soft tissue sarcomas, breast cancer and other neoplasms: A familial cancer syndrome? *Ann Intern Med* 1969; 71:747-52.
120. Bell, DW, Varley J M, Szydlo T E, Kang DH, Wahrer DCR, Shannon KE, Lubratovich M, Verselis SJ, Isselbacher KJ, Fraumeni JF, Birch JM, Li FP, Garber JE, Haber DA. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999; 286: 2528-31.
121. IARC TP53 Database (<http://www.iarc.fr/p53>)
122. Andersson S, Rylander E, Strand A, Sallstrom J, Wilander E. The significance of p53 codon 72 polymorphism for the development of cervical adenocarcinomas. *Br J Cancer* 2001; 85:1153-6.
123. Zerp SF, van Elsas A, Peltenburg LT, Schrier PI. P53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis. *Br J Cancer* 1999; 79:921-6.
124. Akslen LA, Monstad SE, Larsen B, Straume O, OGREID D. Frequent mutations of the p53 gene in cutaneous melanoma of the nodular type. *Int J Cancer* 1998; 79:91-5.
125. An Ş. DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması. *Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler*, Temizkan G, Arda N (editörler). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. Sayfa: 57-67, 1999.
126. Old RW, Primrose SB. Principles of Gene Manipulation. An Introduction to Genetic Engineering. Blackwell Science, Oxford and Northampton, beşinci baskı, 1996.
127. Cotton RGH. Current methods in mutation detection. *Mutat Res* 1993; 285:125-144.
128. Fodde R, Losekoot M. Mutation detection by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Hum Mutat* 1994; 3:83-94.
129. Hamelin R, Jago N, Laurent-Puig P, Vidaud M, Thomas G. Efficient screening of p53 mutations by denaturing gradient gel electrophoresis in colorectal tumors. *Oncogene* 1993; 8:2213-20.

130. Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. Attachment of a 40 base pair G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single base changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:232-236.
131. Alsner J, Sorensen SB, Overgaard J. TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 2001; 59:179-85.
132. Taniere P, Martel-Planche G, Puttawibul P, Casson A, Montesano R, Chanvitan A, Hainaut P. TP53 mutations and MDM2 gene amplification in squamous-cell carcinomas of the esophagus in south Thailand. *Int J Cancer* 2000; 88:223-7.
133. Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D. A Human Genetics Primer. The Genetic Basis of Human Cancer. Vogelstein B, Kinzler KW (editörler). McGraw-Hill, New York. Birinci baskı. 3-31, 1998.
134. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:5463-7.
135. Jin L, Lloyd RV. In situ hybridization: Methods and applications. *J Clin Lab Anal* 1997; 11 :2-9.
136. Blancato JK, Hadda BR. Fluorescent In Situ Hybridization (FISH): Principles and Methodology. Medical Cytogenetics. Mark HFL (editör). Marcel, Dekker, Inc., New York. Birinci baskı. 140-64, 2000.
137. Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 64:600-4.
138. Ensinger C, Obrist P, Rogatsch H, Ramoni A, Schafer G, Mikuz G. Improved technique for investigations on archival formalin-fixed, paraffin-embedded tumors by interphase in-situ hybridisation. *Anticancer Res* 1997; 17:4633-7.
139. Fiche M, Avet-Loiseau H, Heymann M-F, Moussaly F, Digabel C, Joubert M, Classe J-M, Dravet F, Fumoleau P, Ross J, Maugard CM. Genetic alterations in early onset invasive breast carcinomas: Correlation of c-erbB-2 amplification detected by fluorescence *In situ* hybridization with p53 accumulation and tumor phenotype. *Int J Cancer* 1999; 5:511-5.
140. Carbone D, Chiba I, Mitsudomi T. Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene* 1991; 6:1691-2.

141. Akslen LA, Morkve O. Expression of p53 protein in cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 1992; 52:13-6.
142. Whiteman DC, Parsons PG, Green AC. p53 expression and risk factors for cutaneous melanoma: a case-control study. *Int J Cancer* 1998; 77:843-8.
143. Volkenandt M, Schlegel U, Nanus DM, Albino AP. Mutational analysis of the human p53 gene in malignant melanoma. *Pigment Cell Res* 1991; 4:35-40.
144. Albino AP, Vidal MJ, McNutt NS, Shea CR, Prieto VG, Nanus DM, Palmer JM, Hayward NK. Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res* 1994; 4:35-45.
145. Helmbach H, Rossmann E, Kern MA, Schadendorf D. Drug-resistance in human melanoma. *Int J Cancer*, 93:617-22, 2001.
146. Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53 and Tumor cell Sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 1999; 59:1391-1399.
147. Soengas MA, Capodict P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SC. Inactivation of the apoptosis effector *Apaf-1* in malignant melanoma. *Nature* 2001; 409:207-211.
148. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10:687-692.
149. Satyamoorthi K, Bogenrieder T, Meenhard H. No longer a molecular black box-new clues to apoptosis And drug resistance in melanoma. *Trends Mol Med* 2001; 7:191-193.
150. Okami K, Cairns P, Westra WH, Linn JF, Ahrendt SA, Wu L, Sidransky D, Jen J. Detailed deletion mapping at chromosome 9p21 in non-small cell lung cancer by microsatellite analysis and fluorescence in situ hybridization. *Int J Cancer* 1997; 74:588-92.
151. Fujimoto A, Morita R, Hatta N, Takehara K, Takata M. p16INK4a inactivation is not frequent in uncultured sporadic primary cutaneous melanoma. *Oncogene* 1999; 18:2527-32.
152. Kumar R, Smeds J, Lundh Rozell B, Hemminki K. Loss of heterozygosity at chromosome 9p21 (INK4-p14ARF locus): homozygous deletions and mutations in the p16 and p14ARF genes in sporadic primary melanomas. *Melanoma Res* 1999; 9:138-47.
153. Peris K, Keller G, Chimenti S, Amantea A, Kerl H, Hofler H. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in melanoma. *J Invest Dermatol* 1995; 105:625-8.

154. Reed JA, Loganzo F Jr, Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Bogdany JK, Shiel MJ, Haluska FG, Fountain JW, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 1995; 55:2713-8.
155. Healy E, Rehman I, Angus B, Rees JL. Loss of heterozygosity in sporadic primary cutaneous melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 12:152-6.
156. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, Mao L, Herath J, Jenkins R, Westra W, et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genet* 1995; 11:210-2.
157. Kinzler KW, Vogelstein B. Colorectal tumors. *The Genetic Basis of Human Cancer*. Vogelstein B, Kinzler KW (editörler). McGraw-Hill, New York. Birinci baskı, 565-87, 1998.
158. Cachia AR, Indsto JO, McLaren KM, Mann GJ, Arends MJ. CDKN2A mutation and deletion status in thin and thick primary melanoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6:3511-5.
159. Healy E, Sikkink S, Rees JL. Infrequent mutation of p16INK4 in sporadic melanoma. *J Invest Dermatol* 1996; 107:318-21.
160. Sanchez-Cespedes M, Reed AL, Buta M, Wu L, Westra WH, Herman JG, Yang SC, Jen J, Sidransky D. Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1999; 18:5843-9.
161. Lewis DC, Warren N, Shukla VK, Grimshaw D, Laidler P, Padua RA. Gross rearrangements and deletions of the retinoblastoma gene are rare in malignant melanoma. *Acta Derm Venereol* 1993; 73:236.
162. Saenz-Santamaria MC, McNutt NS, Shea CR. Immunohistochemical expression of retinoblastoma protein in cutaneous melanomas. *Br J Dermatol* 1995; 133:890-5.
163. Mertens F, Johansson B, Hoglund M, Mitelman F. Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* 1997; 57:2765-80.
164. Sauter ER, Yeo UC, Von Stemm A, Zhu W, Litwin S, Tichansky DS, Pistritto G, Nesbit M, Pinkel D, Herlyn M, Bastian BC. Cyclin d1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2002; 62:3200-6.

9. EKLER

9.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE CİHAZLAR

1. "NucleoSpin C&T" kiti: Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren-Germany. Katalog no: 740952
2. Pfu polimeraz + tampon: Strategene
3. Betaine: Sigma
4. dNTP: Pharmacia
5. AmpliTaq Gold DNA polimeraz + tampon: Perkin Elmer
6. DMSO: Sigma
7. % 40 akrilamid: Acrylogel 5 Solution, BDH Laboratory Supplies, Electran. Poole, İngiltere
8. Üre: Sigma
9. Formamid: Fluke Chemie
10. Bromophenol Blue-Xylene Cyanol Dye Solution: Sigma
11. N, N, N'-Tetra-methyl-ethylenediamine. TEMED, Biorad Laboratories
12. DGGE cihazı: D GENE DENATURATING ELECTROPHORESIS SYSTEM (Bio-Rad Laboratories. Kopenhag, Danimarka)
13. Terminator mix: ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems
14. Template suppression reagent: Perkin Elmer
15. p16 probu: LSI 9p21/CEP-9 Dual Color Probe (Vysis, Inc.)
16. Retinoblastoma probu: LSI 13/RB-1 Spectrum Orange (Vysis, Inc.)
17. Labeling Mix: Boehringer Mannheim kaynaklı dNTP'ler ve 4 µl Fluorescein-UTP ile metinde tarif edildiği şekilde hazırlandı
18. Nick translation mix: Boehringer Mannheim, Cat No: 1745808
19. Etidyum bromid: Continental Laboratory Products
20. Cot I DNA: Human Cot-I DNA. GIBCO BRL.
21. Salmon DNA: Salmon sperm DNA Solution. GIBCO BRL
22. Tth polimeraz: Boehringer Mannheim
23. SSC (20X): GIBCO BRL
24. DAPI: Sigma
25. Proteinaz K: Roche
26. Avidin Fluorescein: Boehringer Mannheim
27. Tween 20: Merck-Schuchardt.

9.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN PRİMERLER

9.2.1. I. ve II. PCR'da kullanılan primerler:

“Ise” ve “Ias” primerleri I. PCR'da, “se-GC” ve “as-GC” primerleri ise II. PCR'da kullanılmışlardır (se: “sense”; anlamlı. as: “anti sense”; karşıt anlamlı).

5NIse:	5'-	TGC	TGC	CGT	GTT	CCA	GTT	GC-3'	
5Nas:	5'-	CAG	CGC	CTC	ACA	ACC	TCC	G-3'	
5Nse-GC:	5'-	CCC	GCC	GCC	CGC	CGC	TCG	CCC	GCC
		GCG	CCC	CGC	GCC	CGT	CCC	GCC	GCC
		CCC	GCC	CGT	TCA	ACT	CTG	TCT	CCT
		TCC	TCT	TCC-3'					
5CIas:	5'-	GGG	CCA	GAC	CTA	AGA	GCA	ATC	AG-3'
5Cse:	5'-	CCC	CCC	CGC	GCC	ATG	GCC	ATC	TAC-3'
5Cas-GC:	5'-	CCC	GCC	GCC	CGC	CGC	TCG	CCC	GCC
		GCG	CCC	CGC	GCC	CGT	CCC	GCC	GCC
		CCC	GCC	CGG	CTG	GGG	ACC	CTT	TTT
		GGG	CAA	CC-3'					
6Ise:	5'-	TCA	GAT	AGC	GAT	GGT	GAG	CAG	C-3'
6as:	5'-	CGG	AGG	GCC	ACT	GAC	ACC	C-3'	
6se-GC: 5'-	CGC	CCG	CCG	CGC	CCC	GCG	CCC	GTC	
		CCG	CCG	CCC	CCG	CCC	GGT	CCC	CAG
		GCC	TCT	GAT	TCC-3'				
7IIIse:	5'-	CCA	CAG	GTC	TCC	CCA	AGG	CG-3'	
7as:	5'-	GCA	AGC	AGA	GGC	TGG	GGC	AC-3'	
7se-GC: 5'-	CGC	CCG	CCG	CGC	CCC	GCG	CCC	GTC	
		CCG	CCG	CCC	CCG	CCC	GCA	GGT	CTC
		CCC	AAG	GCG	CAC-3'				
8Ise:	5'-	GGT	GGT	TGG	GAG	TAG	ATG	GAG	C-3'
8as:	5'-	AAT	CTG	AGG	CAT	AAC	TGC	ACC	C-3'
8se-GC: 5'-	CGC	CCG	CCG	CGC	CCC	GCG	CCC	GTC	
		CCG	CCG	CCC	CCG	CCC	GAC	TGC	CTC
		TTG	CTT	CTC	TTT	TCC-3'			
9Ias:	5'-	GCC	CCA	ATT	GCA	GGT	AAA	ACA	G-3'
9se:	5'-	GGG	TGC	AGT	TAT	GCC	TCA	GAT	T-3'
9as-GC: 5'-	CGC	CCG	CCG	CGC	CCC	GCG	CCC	GTC	
		CCG	CCG	CCC	CCG	CCC	GCG	GCA	TTT
		TGA	GTG	TTA	GAC	TGG-3'			

9.2.2. III. PCR'da kullanılan primerler

5Nqse:	5'-	TTC	AAC	TCT	GTC	TCC	TTC	CTC	TTC	C-3'
5Nas:	5'-	CAG	CGC	CTC	ACA	ACC	TCC	G-3'		

5Cse:	5'-	CCC	CCC	CGC	GCC	ATG	GCC	ATC	TAC-3'
5Cqas:	5'-	GCT	GGG	GAC	CCT	TTT	TGG	GCA	ACC-3'

6qse:	5'-	GTC	CCC	AGG	CCT	CTG	ATT	CC-3'
6as:	5'-	CGG	AGG	GCC	ACT	GAC	ACC	C-3'

7qse:	5'-	CAG	GTC	TCC	CCA	AGG	CGC	AC-3'
7as:	5'-	GCA	AGC	AGA	GGC	TGG	GGC	AC-3'

8qseI:	5'-	ACT	GCC	TCT	TGC	TTC	TCT	TTT	CC-3'
8as:	5'-	AAT	CTG	AGG	CAT	AAC	TGC	ACC	C-3'

9se:	5'-	GGG	TGC	AGT	TAT	GCC	TCA	GAT	T-3'
9qas:	5'-	CGG	CAT	TTT	GAG	TGT	TAG	ACT	GG-3'

9.3. KISALTMALAR

1. DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis
2. SSCP: Single strand conformational polymorphism
3. PCR: Polymerase Chain Reaction
4. LOH: Loss of heterozygosity
5. İHB: İmmünohistokimyasal boyama
6. Rb: Retinoblastoma