



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**HEPATOSELLÜLER KANSER OLGULARINDA *MISMATCH*
REPAIR GENLERİNE AİT METİLASYON PROFİLİNİN MS-MLPA
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Özge ÖZER**

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Feride İ. ŞAHİN

ANKARA, 2011



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**HEPATOSELLÜLER KANSER OLGULARINDA *MISMATCH
REPAIR* GENLERİNE AİT METİLASYON PROFİLİNİN MS-MLPA
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Özge ÖZER**

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Feride İ. ŞAHİN

ANKARA, 2011

Başkent Üniversitesi Proje No: KA09/185

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimin her aşamasında gösterdiği sabır, verdiği destek ve bilimsel gelişimime olan büyük katkıları nedeniyle örnek almaktan gurur duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Feride İffet Şahin' e,

Asistanlığım süresince bitmeyen desteği, emeği, rehberliği ve güler yüzü için değerli hocam Sayın Doç. Dr. Zerrin Yılmaz Çelik' e,

Bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum Sayın Prof. Dr. F. Belgin Ataç'a, Sayın Doç. Dr. Erkan Yurtçu'ya ve Sayın Dr. Özlem Darcansoy İşeri'ye,

Olgunluğu ve sakinliği ile her zaman desteğini yanımda hissettiğim Uzm. Dr. Özge Özalp Yüreğir'e, arkamı döndüğümde hep orada olduğunu bildiğim ve birçok şeyin yanında bana bir sonraki aşamayı düşünmeyi öğreten ablam Uzm. Kim. Esra Başyigit'e, her zaman çok başarılı olacaklarına inandığım kıymetli asistan arkadaşlarım Dr. Emin Emre Kurt ve Dr. Enver Okan Öte'ye, birlikte çalışma fırsatı bulmaktan eşsiz bir zevk aldığım ve her gün büyüyen ailemizde her birinin desteğini ayrı ayrı hissettiğim çok kıymetli çalışma arkadaşlarım Bio. Elif Yücel, Kim. Derya Ertaş, Uzm. Bio. Sema Akgümüş, Tek. Şeyma Ateş, Uzm. Bio. Beyza Akyazı, Uzm. Bio. Ayşe Özkan ve hep dışarıda ama hep bizimle olan sekreterimiz Nesrin Tellioğlu'na, her fırsatta bir arada olmaktan mutluluk duyduğum kampus ve Kazan ekibine, tez yazım aşamasındaki değerli önerileri için Dr. Yunus Kasım Terzi' ye,

Asistanlık eğitimim süresince hep yanımda olan, desteğini tez yaşım aşamasında da çok uzaklardan bile hissettiğim, hem bilimsel hem de sosyal tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen yol arkadaşım Dr. Tuğçe Bulakbaşı Balcı'ya ve değerleri görüşlerini benimle paylaştığı için eşi Yener Balcı'ya,

Öğrenciliğim ve asistanlığım boyunca yanımda olan, hayatımın her dönemini paylaşacağıma inandığım arkadaşım, kardeşim Dr. Işıl Doğan'a,

Maddi manevi desteklerini eksik etmeyerek bu noktaya gelmemi sağladıkları ve herkesin sahip olabilmesini isteyeceğim birer ebeveyn oldukları için anne ve babama, her zaman mantıklı ve yol gösterici olduğu için kardeşim Özden Özer'e, içindeki sonsuz iyilikle hep yanımda olduğunu bildiğim ve tez aşamasında istatistik çalışmalarını büyük bir sükunetle tamamlayan kardeşim Gözde Özer'e, her zaman yanımda olan diğer aile üyeleri ve arkadaşlarıma özellikle canlarım Çiğdem ve İlke'ye,

Teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Özge ÖZER

ÖZET

Hepatosellüler Karsinom (HCC) major risk faktörlerinin iyi tanımlandığı nadir tümörlerden biridir. Viral hepatitler, alkol, aflatoksin gibi çevresel ajanlar ve diğer etiyolojik faktörler HCC olgularında sıklıkla rastlanmaktadır. Hepatosellüler karsinomun çok faktörlü etiyolojisi karmaşık moleküler patogenezi ile açıklanabilmektedir. Gen ifadenmesi, mutasyonlar, heterozigotluk kaybı ve promotor hipermetilasyonu gibi geniş bir grup moleküler değişiklik HCC olgularında bildirilmiştir.

Çalışmamızda; HCC tanısı almış hastalara ait karaciğer dokusu örneklerinde DNA onarım sistemlerinde görev yapan *MLH1*, *PMS2*, *MSH6*, *MSH2*, *MGMT*, *MSH3* ve *MLH3* genlerine ait promotor metilasyon durumları MS-MLPA yöntemi kullanılarak incelenmiş ve mevcut klinik bulgularla karşılaştırılmıştır. İncelen olgularda en sık etiyolojik neden tek başına HBV enfeksiyonu varlığı (%47,2) olarak tespit edilmiştir. Değerlendirilen 56 olgunun 27'sinde (%48,2) çalışılan genlerden en az birine ait metilasyon, 13 (%23,2) tanesinde sadece tek bir gene ait metilasyon ve 14 (%25) olguda da birden fazla gene ait metilasyon saptanırken, sadece 1 hastada (% 1,8) tüm genlere ait metilasyon saptanmıştır.

Çalışılan yedi gen içerisinde en fazla metilasyon saptanan gen 14 (% 25,0) olgu ile *MSH3* olarak bulunmuştur. Tek tümörü olan bireylerde incelenen genlerden en az birinde artmış metilasyon, multifokal tümörleri olanlara göre anlamlı olarak daha sık görülmüştür. *PMS2* metilasyonu saptanan örneklerde HBV pozitifliği, CHILD sınıfı, tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından anlamlı farklılık saptanmıştır.

Bu sonuçlardan yola çıkarak, MMR sisteminde yer alan genlerin metilasyonunun HCC patogenezinde sorumlu olabileceği ve bu tür çalışmalarda aynı yolakta görevli birden fazla gene ait değişikliğin bir arada değerlendirilmesinin daha fazla bilgi vereceği düşünülmüştür. MS-MLPA uygulaması basit ve maliyeti düşük bir yöntem olmakla birlikte veri analizinde karşılaşılan güçlüklerin ortadan kaldırılması ile yöntemin kullanım alanı genişleyecektir.

Anahtar sözcükler: Hepatosellüler karsinom, DNA onarımı, MS-MLPA, promotor metilasyonu

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the rare tumours with well-defined major risk factors. Frequently seen factors include environmental agents like Hepatitis B and C, alcohol, aflatoxins and other etiological agents. The multifactorial etiology of HCC can be explained by its complex molecular pathogenesis. A wide range of genetic changes; including gene expression changes, mutations, and loss of heterozygosity and promoter hypermethylation; has been reported in HCC.

In the current study, the methylation status of seven genes involved in DNA repair mechanisms, namely *MLH1*, *PMS2*, *MSH6*, *MSH2*, *MGMT*, *MSH3* and *MLH3*, was investigated in tumour samples from HCC patients, using the methylation specific – multiplex ligation dependent probe amplification (MS-MLPA) method and the results were correlated with clinical findings. The most common etiological factor in these cases was the presence of hepatitis B alone (47.2%). Among the 56 cases that were studied, promoter methylation was detected in at least one of the genes in 27 (48.2%) cases, only in one gene in 13 (23.2%) cases and in more than one gene in 14 (25%) cases. Only in one (1.8%) patient, methylation was detected in all of the genes studied.

Of the seven genes investigated, methylation was most frequently observed in *MSH3*, with 14 (25%) cases. Methylation of at least one gene was significantly more frequent in patients with single tumours than multifocal tumours. There were significant differences regarding hepatitis B status, Child class, tumour number, grade and TNM stage in cases where *PMS2* methylation was detected.

These results suggest that methylation of genes involved in mismatch repair may be responsible in the pathogenesis of HCC and evaluating changes in multiple genes in these pathways simultaneously would be more informative. Despite being a robust and relatively inexpensive method, the MS-MLPA assay could be more extensively applied with improvements in the currently intricate data analysis component.

Key words: Hepatocellular carcinoma, DNA repair, MS-MLPA, promoter methylation

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖNSÖZ.....	ii
ÖZET	iii
İNGİLİZCE ÖZET	iv
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. HEPATOSELLÜLER KARSİNOM	2
2.1.1. Tanım ve Epidemiyoloji	2
2.1.2. Cinsiyet ve yaşa göre dağılım.....	2
2.1.3. Risk faktörleri	3
2.1.4. Klinik Bulgular	5
2.1.5. Tanı ve Tarama Yöntemleri.....	5
2.1.6. Patoloji.....	6
2.1.7. Tümör Evrelendirilmesi.....	6
2.1.8. Tedavi	9
2.1.9. Prognostik Faktörler	10
2.1.10. HCC’ de Genetik Değişiklikler	10
2.2. DNA ONARIMI.....	14
2.2.1. DNA Hasarı	14
2.2.2. DNA Onarım Mekanizmaları	14
2.3. EPİGENETİK.....	20
2.3.1. Epigenetik Mekanizmalar	20
2.3.2. DNA metilasyonu ve kanser	24
2.4. Metilasyon tarama yöntemleri.....	25

2.4.1. Tüm genom metilasyon profilinin belirlenmesi	25
2.4.2. Spesifik DNA dizisinde metilasyon durumunun belirlenmesi	26
2.5. Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA).....	27
2.5.1. Genel bilgiler	27
2.5.2. MLPA probu özellikleri.....	27
2.5.3. MLPA' nın kullanım alanları.....	29
2.5.4. Metilasyon Spesifik MLPA (MS-MLPA)	29
2.5.5. MS-MLPA yönteminin avantajları ve dezavantajları.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Yöntem	32
3.1.1. Kullanılan Cihazlar:.....	32
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	33
3.1.3. Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler	33
3.1.4. DNA eldesi	34
3.1.5. MS-MLPA	35
3.1.6. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR.....	42
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇLAR.....	76
7. KAYNAKLAR	77

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
MGMT	O ⁶ -Metil guanin-DNA metil transferaz
MMR	Yanlış eşleşme tamiri (<i>Mismatch repair</i>)
μ	Mikro
a.a.	Aminoasit
AASLD	<i>American Association for the Study of Liver Diseases</i>
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADP	Adenozindifosfat
AFP	Alfa-fetoprotein
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenozintrifosfat
b.ç.	Baz çifti
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
BER	Baz çıkarma onarımı " <i>Base excision repair</i> "
BRCA2	<i>Breast cancer</i>
C	Sitozin
CDH1	<i>E-cadherin</i>
CLIP	<i>The Cancer of the Liver Italian Program</i>
cm	Santimetre
COX2	<i>Cytochrome c oxidase subunit II</i>
CpG	Fosfodiester bağı ile bağlı Sitozin-Guanin
CTNNB1	β-catenin
DNMT	DNA Metil Transferaz
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
EPHX	<i>Epoxide hydrolase</i>
G	Guanin
g/L	gram/Litre
GSTP1	<i>Glutathione S-transferase pi 1</i>
H	Histon
HAT	Histon asetiltransferaz
HbsAg	Hepatit B yüzey antijeni
HBV	Hepatit B Virus
HCC	Hepatosellüler Karsinom
HCV	Hepatit C Virus
HDAC	Histon deasetilaz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IGF2	<i>Insulin-like growth factor</i>

IU/ml	<i>International Unit/mililitre</i>
KLL	Kronik Lenfositik lösemi
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
M6P/IGF 2r	Mannoz-6-fosfat/insülin benzeri büyüme faktörü II reseptör
mg/dl	miligram/desilitre
ml	Mililitre
MLH1	<i>mutL homolog 1</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification</i>
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
MS PZR	Metilasyona özgü PZR
MSH2	<i>mutS homolog 2</i>
MSH3	<i>mutS homolog 3</i>
MSH6	<i>mutS homolog 6</i>
MS- MLPA	Metilasyon Spesifik MLPA
MYC	<i>Myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NER	Nükleotid çıkarma Onarımı (“ <i>Nucleotide excision repair</i> ”)
ng/ml	nanogram/mililitre
p53	<i>Tumor protein p53</i>
PAWS	<i>Predictive Analytics Software</i>
PIK3CA	<i>Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>
PMS2	<i>Postmeiotic segregation increased 2</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RB1	<i>Retinoblastoma 1</i>
RFA	<i>Radiofrequency ablation</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SAM	S-adenozil metiyonin
SIAH1	<i>seven in absentia homolog 1</i>
T	Timin
TACE	<i>transarterial chemoembolization</i>
UV	Morötesi
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WNT	<i>Wingless-type MMTV integration site family</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	HCC evreleme sistemlerine göre kullanılan tedavi algoritmaları	9
Şekil 2.2	Hepatokarsinogenezin ilerleyen aşamalarında sorumlu genetik değişiklikler.....	10
Şekil 2.3	Kanser hücresinde metillenmiş MGMT' nin işlev kaybederek mutasyon oluşumuna neden olması ve normal hücrede metillenmemiş MGMT' nin yanlış metillenmiş guaninlerden metil gruplarını kaldırması	16
Şekil 2.4	BER ve NER'in karşılaştırılması	17
Şekil 2.5	İnaktif haldeki deasetile histon proteinlerinin HAT enzimi ile aktif formu olan asetile hale getirilmesi ve aynı reaksiyonun HDAC enzimi ile tersi yönünde gerçekleştirilmesi.....	21
Şekil 2.6	SAM varlığında DNA metil transferazile sitozin'den 5-metil sitozin oluşumu	22
Şekil 2.7	Normal hücrede ve kanser hücresinde DNA metilasyonunun sonuçları	23
Şekil 2.8	Hipo ve hipermetilasyonun meydana geldiği bölgeler ve kanseri oluşturan mekanizmalar	24
Şekil 2.9	MLPA probu ile iki farklı hedef bölgenin amplifikasyonu sonucu farklı uzunlukta ürün elde edilmesi	28
Şekil 2.10	MS-MLPA yöntemi ile metillenmiş ve metillenmemiş hedeflerin gösterilmesi	30
Şekil 3.1	Kesilmemiş örneğe ait Q- D fragmanları, prob bölgelerine ait pik görüntüleri	39
Şekil 4.1	HCC etiyojisine göre olguların yüzdeleri	43
Şekil 4.2	Yedi numaralı olguya ait MLPA görüntüsü.....	47

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1	Okuda evrelemesi	7
Tablo 2.2	CLIP sınıflandırması	7
Tablo 2.3	TNM evrelemesi	8
Tablo 2.4	BCLC evreleme sistemi.....	8
Tablo 2.5	HCC' nin moleküler patogenezinde tanımlanan genlerin hücrel işlevleri, fonksiyonel değişiklikleri ve görülme sıklıkları	13
Tablo 2.6	DNA onarım genlerinde meydana gelen somatik mutasyonlar sonrası oluşan hastalıklar	15
Tablo 2.7	MMR sisteminde görevli proteinlerin <i>E. Coli</i> 'de ve insandaki homologları ve fonksiyonları	18
Tablo 3.1	SALSA MS-MLPA ME011-A1 MMR kitine ait problemlerin ürün uzunlukları, kesim bölgesi varlığı ve kromozomal pozisyonları.....	40
Tablo 4.1	Yaş gruplarına göre rastlanma sıklıkları ve yüzdeleri	42
Tablo 4.2	HCC etiyojisi bilinen olgulara ait rastlanma sıklıkları ve yüzdeleri	42
Tablo 4.3	Tedaviye yönelik karaciğer nakli yapılan 19 hastanın klinik özellikleri	43
Tablo 4.4	Hasta ve kontrol grubunda elde edilen metilasyon oranları	44
Tablo 4.5	Hastalarda tüm genlerde metilasyon durumları.....	45
Tablo 4.6	Çalışılan her bir gene ait metillenmiş ve metillenmemiş örnek sayıları ve yüzdeleri.....	46
Tablo 4.7	Tümör sayısı, Grade, TNM evresi, AFP yüksekliği ve HBV ya da HCV pozitifliğine karşı metilasyon varlığının karşılaştırılması.....	48
Tablo 4.8	AFP değerlerinin normal veya yüksek olmasına göre her bir gene ait metilasyon durumlarının karşılaştırılması	49
Tablo 4.9	AFP değerleri ortalamasına göre her bir gene ait metilasyon durumlarının karşılaştırılması.....	50

Tablo 4.10	<i>MLH1</i> geni metilasyonu ile cinsiyet, kan grubu, etiyoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılması	51
Tablo 4.11	<i>MLH1</i> geni metilasyonunun diğer genlere ait metilasyon durumları ile ilişkisi	52
Tablo 4.12	<i>PMS2</i> geni metilasyonu ile cinsiyet, kan grubu, etiyoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılması.....	53
Tablo 4.13	<i>PMS2</i> geni metilasyonunun diğer genlere ait metilasyon durumları ile ilişkisi	54
Tablo 4.14	<i>MSH6</i> geni metilasyonu ile cinsiyet, kan grubu, etiyoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılması	55
Tablo 4.15	<i>MSH6</i> geni metilasyonunun diğer genlere ait metilasyon durumları ile ilişkisi	56
Tablo 4.16	<i>MSH2</i> geni metilasyonu ile cinsiyet, kan grubu, etiyoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılması	57
Tablo 4.17	<i>MGMT</i> geni metilasyonu ile cinsiyet, kan grubu, etiyoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılması	58
Tablo 4.18	<i>MGMT</i> geni metilasyonunun diğer genlere ait metilasyon durumları ile ilişkisi	59
Tablo 4.19	<i>MSH3</i> geni metilasyonu ile cinsiyet, kan grubu, etiyoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılması	60
Tablo 4.20	<i>MGMT</i> geni metilasyonunun diğer genlere ait metilasyon durumları ile ilişkisi	61
Tablo 4.21	<i>MSH3</i> geni metilasyonu ile cinsiyet, kan grubu, etiyoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılması	62
Tablo 4.22	<i>MLH3</i> geni metilasyonunun diğer genlere ait metilasyon durumları ile ilişkisi	63
Tablo 4.23	Değerlendirilen genlerin metilasyon durumu ve HBV pozitifliği ilişkisi	64
Tablo 4.24	Değerlendirilen genlerin metilasyon durumu ve HCV pozitifliği ilişkisi	65

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatosellüler karsinom (HCC), primer karaciğer kanserlerinin yaklaşık %90 kadarını oluşturmaktadır. Dünyada HCC en sık rastlanan beşinci neoplazm olup aynı zamanda kanser ilişkili ölümlerin en sık üçüncü nedenidir. Sıklıkla kronik karaciğer hastalığı ve sirotik zemin üzerinde gelişen bu tümör oldukça saldırgan seyirlidir.

HCC major risk faktörlerinin iyi tanımlandığı nadir tümörlerden biridir. Olguların %80'inde kanser sirotik karaciğer zemininde gelişir ve siroz en kuvvetli yatkınlık oluşturan faktördür. Siroza neden olan etiyolojik faktörler ise HCC olgularında çok yüksek oranda bildirilmektedir. Viral hepatitler, alkol, aflatoksin gibi çevresel ajanlar ve diğer etiyolojik faktörler HCC olgularında sıklıkla rastlanmaktadır.

Hepatosellüler karsinomun çok faktörlü etiyolojisi karmaşık moleküler patogenezi ile açıklanabilmektedir. Çevresel etkenlerle kuvvetli ilişkisi gösterilmiş bu hastalıkta somatik hücrelerde sonradan oluşan genetik değişikliklerin karsinogenezde etkili olması şaşırtıcı değildir. Buna rağmen insanlarda HCC gelişiminden sorumlu özgül değişikliklerin sadece küçük bir kısmı bilinmektedir. Gen ifadenmesi, mutasyonlar, heterozigotluk kaybı ve promotor hipermetilasyonu gibi geniş bir grup moleküler değişiklik HCC olgularında bildirilmiştir. DNA tamir mekanizmalarında görev yapan *MGMT*, *MLH1* ve *MLH3* genlerine ait az sayıda metilasyon ve ifadenme çalışması bulunmakla birlikte HCC patogenezinde DNA onarım genlerinin tümüne ait metilasyon profillerinin değerlendirildiği bir çalışma yapılmamıştır.

İnsan kanserlerinde, tümör oluşumunu önlemek ya da hücre döngüsünü korumak ile görevli genlerin fonksiyonlarının promotor metilasyonu ile baskılanması bilinen bir mekanizmadır. Promotor bölge metilasyonunu göstermede kullanılan yöntemlere son yıllarda kullanıma giren MLPA (*Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification*) da eklenmiştir. MS-MLPA (Metilasyon Spesifik- MLPA) ile aynı anda birden fazla gen bölgesinin metilasyon profili belirlenebilmektedir.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda; HCC tanısı almış hastalara ait karaciğer dokusu örneklerinde DNA onarım sistemlerinde görev yapan *MLH1*, *PMS2*, *MSH6*, *MSH2*, *MGMT*, *MSH3* ve *MLH3* genlerine ait metilasyon durumlarının MS-MLPA yöntemi kullanılarak incelenmesi ve mevcut klinik bulgularla ilişkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HEPATOSELLÜLER KARSİNOM

2.1.1. Tanım ve Epidemiyoloji

Primer karaciğer kanseri dünya çapında önemli bir sağlık problemidir. Dünyada en sık beşinci neoplazm olan bu tümör aynı zamanda kanser ilişkili ölümlerin en sık üçüncü nedenidir. Primer karaciğer tümörleri arasında en sık görülen tip hepatosellüler karsinomdur. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde primer karaciğer tümörlerinin % 70-75'i, Güney ve Güneydoğu Asya gibi yüksek riskli bölgelerde ise % 90'ı HCC'dir (1) .

HCC sıklıkla kronik karaciğer hastalığı ve sirotik zemin üzerinde gelişen oldukça saldırgan seyirli bir tümördür. Her yıl yaklaşık 500.000 yeni vaka tanı almaktadır ve yaşa göre düzeltilmiş insidansı her 100.000 kişide 5,5-14,9 kadardır (2).

En sık görüldüğü bölgeler Doğu ve Güneydoğu Asya ve Sahraaltı Afrika'dır. En az görüldüğü bölgeler ise Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'dır. Çin'in Güney Guangxi bölgesi oldukça yüksek riskte bir bölgedir ve bir yıllık insidansı kadınlar için yaklaşık, 30/100.000 ve erkekler için ise 120/100.000 kadardır. Tam tersine Danimarka'da kadın ve erkeklerde oranlar sırasıyla 0,6/100.000 ve 1,6/100.000 olarak belirlenmiştir (2).

Sağlık Bakanlığı tarafından 2003 yılında yayınlanan raporda ülkemizde HCC sıklığı 0,83/100.000 olarak bildirilmiştir. (3)

2.1.2. Cinsiyet ve yaşa göre dağılım

HCC'nin görüldüğü tüm toplumlara bakıldığında erkeklerde daha sık rastlandığı dikkati çekmektedir. Erkeklerde görülme oranı kadınlara göre 2-3 kat fazladır. Düşük riskli toplumlarda hastalık 40 yaşından önce oldukça nadirdir. Diğer epitelyal kanserlere benzer şekilde hastalık sıklığı 50 yaş civarında artmaktadır. Yüksek riskli toplumlarda hastalık başlangıcı daha erken yıllarda görülebilmektedir. Erkeklerde ortalama başlangıç yaşı 40-49, kadınlarda ise daha ileri yaşlarda daha nadir olmakla birlikte 50-59'dur (4).

2.1.3. Risk faktörleri

HCC major risk faktörlerinin iyi tanımlandığı nadir tümörlerden biridir. Olguların %80'inde kanser sirotik karaciğer zemininde gelişir ve siroz en kuvvetli yatkınlık oluşturan faktördür. İnsidans gibi, etiyolojik özellikler de coğrafi farklılıklar gösterir. Asya ve Afrika'da hepatit B virus (HBV) enfeksiyonu kontamine besinlerle birlikte alınan aflatoksinlerle birlikte hastalığa yol açan en sık sebeptir (4). Aflatoksin B gibi çevresel karsinojenler, tümör baskılayıcı bir gen olan *p53* geninin 249. Kodonunda oluşan spesifik bir mutasyon ile birlikte olduğunda tümör gelişme riskini 3 kat kadar artırır (5). Doğu ülkelerinde ve Japonya'da hepatit C virus (HCV) enfeksiyonu, siroza neden olan alkol kullanımı ve hemakromatozis gibi diğer faktörler kadar etkili faktörlerdir. Sigara gibi diğer karsinojenik ajanların etkisi tam olarak gösterilememiştir (4).

2.1.3.1. Viral Hepatitler

HCC sıklıkla kronik viral enfeksiyonun uzun dönem sonucu olarak meydana gelir. Gelişmekte olan ülkelerde kronik HBV enfeksiyonu olan genç bireyleri etkilerken, gelişmiş ülkelerde daha ileri yaşta ve HCV enfeksiyonu olan bireyleri etkiler (4).

HBV hepadnavirusler olarak adlandırılan hepatotropik virusler grubunda bir DNA virusüdür. HCC için en önemli risk faktörü olarak kabul edilen HBV enfeksiyonu HCC olgularının %80'i ile ilişkilendirilmiştir (6). HBV enfeksiyonuna bağlı kronik inflamasyonun tetiklediği oksidatif stres ve sonrasında gelişen siroz HCC gelişiminde suçlanan ilk mekanizmadır. İkinci bir mekanizma olarak, HBV taşıyıcı bireylerde görülen HCC' de, HBV DNA dizisinin genomik DNA'ya entegre olduğu düşünülmektedir. Virus insan genomuna oldukça değişken ve rastgele bölgelerden entegre olur. Bazı onkogenlere ait tek nükleotid değişiklikleri ya da amplifikasyonların HBV DNA entegrasyonu ile ilişkisi de nadir olarak bildirilmektedir (7). Son olarak HBV genomunun kodladığı X antijeninin malign değişime yol açtığı gösterilmiştir. X antijeninin hücre çoğalmasını arttırdığı, tümör baskılayıcı genlere bağlanarak onları inaktive ettiği ve DNA onarım mekanizmalarını bozduğu bilinmektedir (8). Güney Çin gibi yüksek riskli popülasyonlarda hepatit B yüzey antijeninin (HbsAg; kronik hastalığı gösterir) serumda gösterilmesi HCC gelişiminde tek başına en önemli belirteçtir. HbsAg pozitif Çinli erkeklerde aynı yaş

grubundaki HbsAg negatif bireylere göre hastalık geliştirme riskinin 40-100 kat arttığı gösterilmiştir (9, 10). Buna rağmen HBV maruziyetinin düşük olduğu toplumlarda HbsAg pozitifliğinin HCC gelişiminde büyük bir rolü olmadığı gösterilmiştir (1). Kronik HBV taşıyıcılarında HCC gelişme riski taşıyıcı olmayan bireylerle karşılaştırıldığında 100 kat daha fazladır ancak erişkin çağda enfeksiyona yakalanmak riski azaltır. Sirotik bireylerde HCC gelişme riski % 2-6,6 iken sirotik olmayan bireylerde bu oran % 0,4'tür (4).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalara göre Türk toplumunda HCC gelişiminde birincil risk faktörü %44,4 oranla HBV enfeksiyonu olarak belirlenmiştir. (3, 11).

HCV "*flaviviridae*" ailesinden bir RNA virusudur. Çeşitli popülasyonlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar insanlarda HCC gelişiminde kronik HCV enfeksiyonunun majör neden olduğunu göstermiştir (12). Buna rağmen dünya çapında hastalığın dağılımında önemli bir çeşitlilik gözlenmektedir. Çin gibi yüksek riskli popülasyonlarda HCC gelişiminde HCV göreceli olarak küçük bir rol oynamaktadır (1, 13) . Diğer taraftan da Japonya ya da Güney Avrupa gibi orta riskli ve ABD gibi düşük riskli toplumlarda HCV tüm HCC vakalarının önemli bir kısmından sorumlu tutulmaktadır (12).

2.1.3.2. Aflatoksinler

İnsanlarda aflatoksin maruziyeti, bazı tahılların kötü saklanması sonucu ortaya çıkan mikotoksinlerin küflü gıdalar ile birlikte sindirim yolu ile alınmasıyla oluşur (1). Yapılan tanımlayıcı çalışmalarda diyetle alınan aflatoksin maruz kalan bireylerde HCC görülme oranları karşılaştırılmış ve maruziyet dozu ile hastalık insidansı arasında doğrusal ilişki gösterilmiştir (9, 14, 15, 16). Aflatoksin maruziyetinin göstergesi olarak üriner metabolitlerin kullanıldığı çalışmalarda aflatoksin tespit edilen bireylerde tespit edilmeyenlere göre dokuz kat fazla HCC geliştiği gösterilmiştir. (17, 18). Diğer bir bulguya göre aflatoksin maruziyetiyle birlikte HBV taşıyıcısı olan bireyler negatif bireylere göre 60 kat daha fazla hastalık geliştirmektedirler (17). Aflatoksinlerin karsinogenik potansiyellerini tam olarak gösterebilmeleri için metabolik aktivasyona ihtiyaçları vardır. Bu nedenle metabolik yolda görevli enzimlerin polimorfizmlerinin, aflatoksin maruziyeti olan toplumdaki bireysel çeşitliliği açıklayabildiği öne sürülmektedir (1). Yapılan çalışmalarda *EPHX* ve *GSMT1* genlerine ait belirli

polimorfizmlerin aflatoksin maruziyeti olan bireylerde HCC gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (19, 20).

2.1.4.Klinik Bulgular

Hastaların çoğunda erken dönemde belirgin bir yakınma yoktur. Kompanse sirozlu hastalarda ani gelişen asit, ensefalopati, sarılık veya varis kanaması gibi karaciğer yetmezliği belirtilerinin ortaya çıkması HCC açısından önemlidir. Sağ üst kadranda belli belirsiz bir karın ağrısı, beraberinde halsizlik, kilo kaybı, erken doyma hissi veya üst batında ele gelen kitle gibi yakınmalar eşlik edebilir. Daha az sıklıkla görülen bulgular ise tıkaçıcı sarılık, diyare, kemik ağrısı veya dispne, batın içi kanama, ateş ve paraneoplastik sendromlardır (hipoglisemi, eritrositozis, hiperkalsemi veya ciddi diyare) (21).

HCC hastalarında fizik muayene bulguları genellikle altta yatan karaciğer hastalığına bağlı olarak (splenomegali, asit, sarılık veya dekompanse sirozun diğer bulguları) ortaya çıkmaktadır (21).

2.1.5. Tanı ve Tarama Yöntemleri

AASLD (*American Association for the Study of Liver Diseases*) tarafından bildirilen ilkelere göre, altta yatan karaciğer hastalığı (örn. siroz, kronik viral hepatitler) olan bireylerde serum alfa-fetoprotein (AFP) değerinde yükselme varsa HCC açısından ileri tetkikler istenmelidir (22). Bu hastalara ilk tanı basamağı olarak, karaciğere yönelik bilgisayarlı tomografi taraması ve/veya manyetik rezonans görüntüleme tetkiki yapılmalıdır (23).

Takip gerektiren hastalar ise AASLD önerilerine göre iki grupta incelenir (22):

- HBV taşıyıcıları
 - ≥40 yaş Asyalı erkekler
 - ≥50 yaş Asyalı kadınlar
 - Tüm sirozlu HBV taşıyıcıları
 - Her yaşta, ailesinde HCC olan kişiler

- ≥ 20 yaş Afrikalılar, Afrika kökenli Amerikalılar
- Siroz hastaları (HBV dışı)
 - Hepatit C
 - Hemakromatozis
 - Primer Biliyer Siroz
 - Alkolik karaciğer sirozu

2.1.6. Patoloji

HCC makroskopik olarak unifokal, multifokal ve diffüz infiltratif olarak üç şekilde görülebilir. Bu tiplerin tümünde sirotik rejeneratif nodüller ile neoplastik nodüllerin ayrımı zor olmaktadır. HCC'nin tüm tiplerinde vasküler yatağa invazyon yapma eğilimi vardır. Histopatolojik olarak baktığımızda ise hepatositleri taklit eden iyi diferansiye bir tümör ya da dev tümör hücrelerinden oluşan az diferansiye bir lezyon olarak görülebilir. HCC ileri kanser evrelerine kadar karaciğer içinde kalmaya meyillidir. Son dönemlerde tümör, bölgesel lenf ganglionları, akciğer, kemikler gibi ekstra hepatic bölgelere yayılır (24).

2.1.7. Tümör Evrelemesi

Onkolojide tümör evresi hastalık prognozunu belirlemede önemli bir gösterge olarak kullanılır. Ancak hepatosellüler karsinomda bu durum biraz daha karmaşıktır. Bu nedenle tümör sınıflamalarında yaş ve histolojik derece gibi faktörler de bir arada değerlendirilir. *European Association for the Study of the Liver* (EASL), tümör evresi, karaciğer işlev kaybının derecesi, hastanın genel durumu ve tedavi etkinliği olmak üzere birbiri ile ilişkili dört faktörün bir arada değerlendirilmesini önermektedir. (25). Bunlara göre her biri farklı değişkenleri içeren farklı evreleme sistemleri HCC tanı ve takibinde kullanılmaktadır.

Son yıllarda oldukça sık kullanılan Okuda evrelemesinde ise karaciğer fonksiyonunu gösteren (albumin, asit ve bilirubin gibi) parametreler ve tümörün büyüklüğü kullanılmaktadır (Tablo 2.1) (26). Bu sınıflama ile ileri semptomatik evrede tanı alan bireylerin sınıflandırılmasını sağlamak ve son dönem hasta grubunu belirlemede oldukça kullanışlı olmaktadır.

Tablo 2.1. Okuda evrelemesi (26)

Parametre	Pozitif	Negatif
Tümör Büyüklüğü (%)*	≥ 50	<50
Asit	Var	Yok
Albumin (g/L)	≤ 30	>30
Bilirubin (mg/dl)	≥ 3	<3

Evre 1: Hepsi negatif, Evre 2: 1 veya 2 pozitif, Evre 3: 3 veya 4 pozitif

* Total Karaciğer Hacmine göre

The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) skoru retrospektif bir çalışma sonucu oluşturulmuş ve kabul görmüştür (27). Sınıflama sisteminde kullanılan parametreler ve her parametrenin karşılığı olan değer Tablo 2.2'de gösterilmiştir. Buna göre dört farklı değişkenle yedi basamaklı bir evreleme sistemi oluşturulmuştur. TNM ve Okuda evrelemeleri ile karşılaştırıldığında ayırt edici gücü daha iyi görülmektedir.

Tablo 2.2. CLIP sınıflandırması (27)

Parametre	Skor
Child-Pugh	
A	0
B	1
C	2
Tümör morfolojisi	
Uninodüler ve tümörün genişliği $<50\%$	0
Multinodüler ve tümörün genişliği $<50\%$	1
Masif ya da tümörün genişliği $>50\%$	2
Alfa fetoprotein	
<400 ng/ml	0
>400 ng/ml	1
Makrovasküler invazyon	
Yok	0
Var	1

CLIP 0: 0 puan, CLIP 1 : 1 puan, CLIP 2: 2 puan

Geleneksel TNM evrelemesinde ise diğer tümörlerde olduğu gibi tümörün yaygınlığına göre hastalık evresi oluşturulmaktadır . Ancak yapılan çalışmalarda tedavi seçiminde

özellikle rezeksiyon ya da transplantasyon seçeneklerinin belirlenmesinde bu evrelemenin yetersiz kaldığı belirtilmiştir. TNM evrelemesi için kriterler Tablo 2.3'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3. TNM evrelemesi

Evre	T	N	M
1	T1	N0	M0
2	T2	N0	M0
3	T3	N0	M0
	T1-3	N1	M0
4a	T4	N0-1	M0
4b	T0-4	N0-1	M1

T: Tümör, N: Lenf Nodu, M: Metastaz

BCLC (*Barcelona Clinic Liver Cancer*) evreleme sistemi 4 evreden oluşmaktadır ve primer lezyonun büyüklüğü, performans durumu, konstitüsyonel semptomların varlığı, vasküler invazyon, ekstrahepatik yayılım ve Okuda evrelemesini içermektedir (Tablo 2.4) (28).

Tablo 2.4. BCLC evreleme sistemi (28)

Evre	PST	Tümör Evre	Okuda Evre	Portal Hipertansiyon	Biluribin	Child-Pugh
A1	0	Tek	I	Yok	Normal	
A2	0	Tek	I	Var	Normal	
A3	0	Tek	I	Var	Anormal	
A4	0	<3 cm 3 tümör	I-II			A-B
B	0	Büyük Multinodüler	I-II			A-B
C	1-2	Vasküler invazyon Ekstrahepatik yayılım	I-II			A-B
D	3-4	Herhangi biri	III			C

Evre A: early (erken) HCC

Evre B: intermediate (ara) HCC

Evre C: advanced (ileri) HCC

Evre D: end stage (son evre) HCC

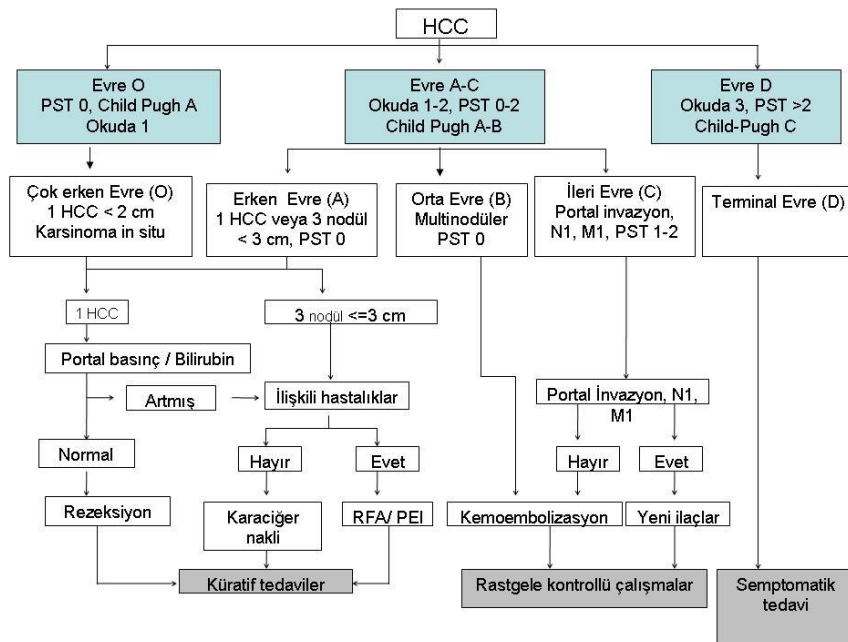
2.1.8. Tedavi

Klasik olarak HCC tedavisi küratif ve palyatif yöntemler olarak ikiye ayrılır. HCC’de en etkili tedavi yöntemi cerrahi tedavidir, ancak hastaların çoğunluğunda tanı esnasında tümör yayılımı veya altta yatan karaciğer hastalığının ağırlığı nedeniyle cerrahi açılarından geç kalmaktadır. Cerrahi dışında pek çok tedavi seçenekleri mevcuttur:

- Karaciğer nakli
- Radyofrekans ablasyon (“*radiofrequency ablation*”- RFA)
- Perkütan etanol veya asetik asit ablasyonu
- Transarteriyel kemoembolizasyon (“*transarterial chemoembolization*”- TACE)
- Kriyoablasyon (“*Cryoablation*”)
- Radyasyon tedavisi
- Sistemik kemoterapi

Rezeksiyon, karaciğer transplantasyonu ve perkütan ablasyon gibi küratif tedaviler tam cevap oranlarını arttırmakta ve yaşam süresini uzatmaktadır. Palyatif tedavi ile kür sağlanmasa da bazı vakalarda iyi cevap oranları elde edilmektedir (28).

Barselona çalışma grubunun önerilerine göre HCC hastalarında erken dönem, ara dönem, ileri dönem ve terminal dönem olmasına göre tedavi basamakları belirlenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. HCC evreleme sistemlerine göre kullanılan tedavi algoritmaları (28)

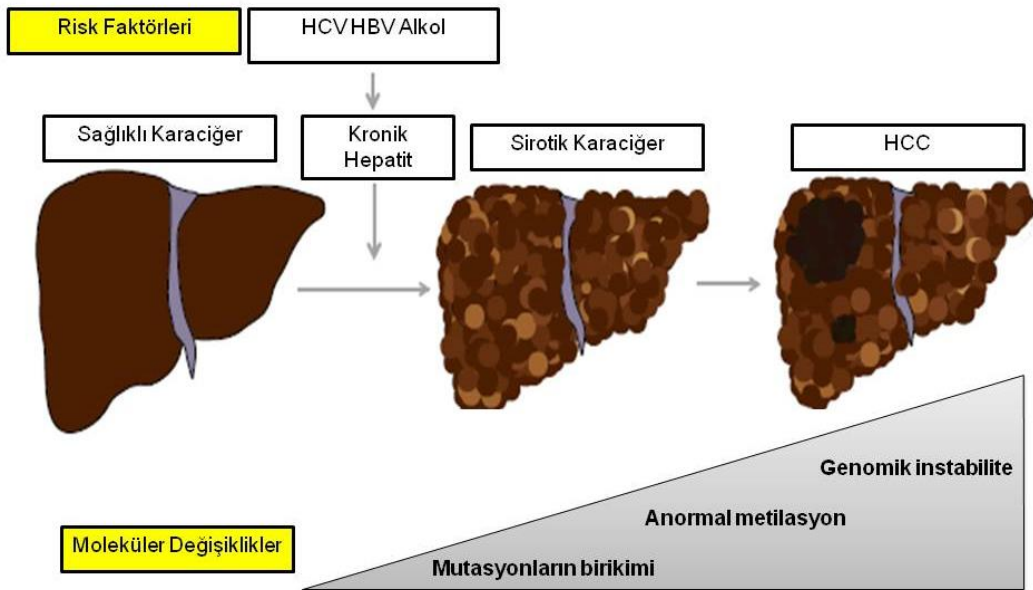
2.1.9. Prognostik Faktörler

Yaklaşık 20 yıl önce HCC prognozunun oldukça kötü olduğu rapor edilmekteydi ve bu dönemde tedaviye rağmen sağ kalım süresi bir yıldan az olarak bildirilmekteydi (26). Gelişmiş ülkelerde uygulanan küratif tedaviler ile bu beklentiler tamamen değişmiş ve doğru evrede tanı alınması sağlanmıştır. Bu nedenle prognoz tahminleri sırasında hastalığın evresi mutlaka dikkate alınmaktadır (26).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada ortalama yaşam süresi 14 ay olarak belirlenirken cinsiyet, TNM evresi ve AFP düzeyleri yaşam süresinde etkili prognoz belirleyici faktörler olarak bildirilmiştir (3).

2.1.10. HCC' de Genetik Değişiklikler

Hepatosellüler karsinomun çok faktörlü etiyojisi karmaşık moleküler patogenezi ile açıklanabilmektedir. İnsanlarda HCC gelişiminden sorumlu özgül değişikliklerin sadece küçük bir kısmı bilinmektedir. Bu genetik değişikliklerden biri olan heterozigotluk kaybı tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile ilişkilidir. Hepatokarsinogenezin ilerleyen aşamalarında rol oynadığı düşünülen genetik faktörler Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Hepatokarsinogenezin ilerleyen aşamalarında sorumlu genetik değişiklikler (43)

HCC gelişiminde 1p, 1q, 2q, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 13q ve 17p bölgeleri heterozigotluk kaybının bildirildiği bölgelerdir ve bunlardan bazılarının HBV enfeksiyonunun varlığı olmaksızın hastalık oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir. Tüm genom karşılaştırmalı hibridizasyon çalışmalarını karşılaştıran bir meta analizde; *RBI* (*Retinoblastoma1*)(13q), *CDH1* (*E-Cadherin*)(16q), *SIAH1* (16q) ve *p53* (17p) bölgeleri hastalıkla yüksek oranda ilişkili bölgeler olarak gösterilmiştir. Yine bu çalışmaya göre 4q, 13q ve 16q bölgelerine ait kayıplar yüksek oranda HBV ve hastalık ilerleyişi ile ilişkili bulunmuş, ek olarak 1q kazanımlarının HCC patogenezinde erken bir olay olduğu belirlenmiştir (29). HBV ilişkili yeniden düzenlenmeler 17. kromozom üzerinde gösterilmiştir. 17p13.1 bölgesine yerleşik *p53* geni komşuluğunda haritalanmış değişiklikler bildirilmiştir. *p53* geni ya da proteininin inaktivasyonu belirgin şekilde HCC'nin moleküler patogenezinde katkıda bulunmaktadır. Aflatoksin maruziyeti ve kronik viral hepatitlerin HCC gelişiminde en sık risk faktörü olarak belirlendiği coğrafyalar olan Sahraaltı Afrika ve Çin'de, *p53* geni 249. kodonunun üçüncü pozisyonunda meydana gelen ve G:C'den T:A'ya dönüşüm ile sonuçlanan nokta mutasyonu yüksek oranda saptanmıştır (30, 31, 32). Aflatoksin maruziyetine doz bağımlı bir cevap olarak tümörsüz karaciğer dokusunda kodon 249 mutasyonunu taşıyan hücrelerin artan oranda saptanması, hepatokarsinogenez sırasında erken bir olay olduğunun göstergesi olarak düşünülmektedir (33). Ters durumda ise aflatoksin maruziyetinin az olduğu popülasyonlarda yapılan çalışmalar ile diğer *p53* mutasyonlarının geç karsinogenezde ortaya çıktığı gösterilmiştir (34, 35, 36). Wilson hastalığı, HBV, HCV ve vinil klorid gibi diğer etiyolojik faktörlerle de ilişkili birçok *p53* gen mutasyonu bildirilmiştir (33).

Kanser patogenezi ile yapılan araştırmalarda sıklıkla karşımıza çıkan farklı sinyal yollarına ait değişiklikler de HCC' de gösterilmiştir (37).

Gen ifadenmesi, mutasyonlar, heterozigotluk kaybı ve promotor hipermetilasyonu gibi geniş bir grup moleküler değişikliği içeren karşılaştırmalı bir analizde HCC için 6 gruptan oluşan bir moleküler sınıflama (G1–G6) öne sürülmüştür. Kısaca, G5-6 WNT yolu aktivasyonunu, G2 AKT sinyal yolunu ve G1-2-3 ise hücre döngüsü ile ilişkili genlere ait değişiklikleri içermektedir (38).

Bu tümörlerde ve ek olarak adenomlarda bildirilen diğer heterozigotluk kaybı ile ilişkili gen ise 6q bölgesinde yerleşmiş mannoz-6-fosfat/insülin benzeri büyüme faktörü II reseptör (M6P/IGF2r) lokusudur. Bu reseptör, büyüme faktörü (TGF-Beta) inhibisyonu ve

kuvvetli mitojen bir proteinin (IGF2) degradasyonu için gerekli olduğundan reseptörün işlev kaybı ya da inaktivasyonu durumunda karaciğer hücre büyümesi hızlanmaktadır (7).

Yanlış eşleşme tamiri (*Mismatch repair- MMR*) genleri ile HCC' nin ilişkisi şimdiye dek az sayıda çalışmada incelenmiştir. Bu çalışmalardan birinde bu genlere ait azalmış ifadenme düzeyleri gösterilmiştir. Ancak bu genlerin ifadenmesinin azalmasına neden olan mekanizma tam olarak ortaya konulamamıştır (39).

HCC gelişiminde epigenetik değişimler özellikle de anormal CpG (Fosfodiester bağı ile bağlı Sitozin-Guanin) adacık metilasyonu farklı çalışmalarda gösterilmiştir (40, 41). Aynı zamanda *p16*, *COX2*, *E-Cadherin* ve *GSTP1* genlerinin metilasyonunun farklı karsinogenez aşamalarında etkili olduğu kanıtlanmıştır (42). HCC moleküler patogenezi ile ilişkili çalışmalar, bu genlerin moleküler fonksiyonları, mutasyon mekanizmaları ve oluşan fonksiyon değişiklikleri ile HCC patogenezinde bildirilmiş rastlanma sıklıkları Tablo 2.5'te gösterilmiştir.

Tablo 2.5. HCC' nin moleküler patogenezinde tanımlanan genlerin hücresel işlevleri, fonksiyonel değişiklikleri ve görülme sıklıkları (43)

Gen	Moleküler Fonksiyon	Mekanizma	Fonksiyonel Değişiklik	Sıklık (%)
<i>P53</i>	Hücre Döngüsü	Mutasyon DNA kopya değişiklikleri Metilasyon Ekspresyon	İşlev kaybı Heterozigotluk Kaybı Kazanım Azalma	0-67 14
<i>CDKN2A (p16)</i>	Hücre Döngüsü	Mutasyon Metilasyon Ekspresyon	İşlev kaybı Kazanım Azalma	13 56-83
<i>CCND1 (Cyclin D1)</i>	Hücre Döngüsü	DNA kopya değişiklikleri Ekspresyon	Amplifikasyon Azalma	7
<i>RB1 (Retinoblastoma1)</i>	Hücre Döngüsü	Mutasyon DNA kopya değişiklikleri	İşlev kaybı Heterozigotluk Kaybı	15
<i>CTNNB1 (b-catenin)</i>	(b- Diferansiyasyon/ proliferasyon	Mutasyon Ekspresyon	İşlev kazandıran Artma	0-44
<i>CDH1 (E-cadherin)</i>	(E- Diferansiyasyon/ proliferasyon	DNA kopya değişiklikleri Metilasyon Ekspresyon	Heterozigotluk kaybı Kazanım Azalma	
<i>MYC</i>	Diferansiyasyon/ proliferasyon	DNA kopya değişiklikleri Metilasyon Ekspresyon	Amplifikasyon Kayıp Artma	30
<i>PIK3CA</i>	Büyüme Faktörü	Mutasyon Ekspresyon	İşlev Kazandıran Artma	0-35
<i>PTEN</i>	Büyüme Faktörü	Mutasyon DNA kopya değişiklikleri Ekspresyon	İşlev kaybı Heterozigotluk kaybı Azalma	0-11
<i>KRAS</i>	Büyüme Faktörü	Mutasyon Ekspresyon	İşlev kazandıran Artma	3-42
<i>IGF2</i>	Büyüme Faktörü	Mutasyon Ekspresyon	İşlev kazandıran Artma	12-44
<i>VEGF</i>	Büyüme Faktörü	DNA kopya değişiklikleri Ekspresyon	Amplifikasyon Artma	5

2.2. DNA ONARIMI

2.2.1. DNA Hasarı

Genetik kararlılığın korunması için DNA kopyalanmasının düzgün şekilde devam ettirilmesine ek olarak DNA'da oluşan hataların da onarımı gerekmektedir. DNA hasarına neden olan iç ve dış etkenler belirlenmiştir (44).

DNA hasarına neden olan hücre dışı ajanlar şunlardır;

- ◆ İyonizan radyasyon: Gama ya da X ışınları tek ya da çift zincir DNA kırıklarına neden olur
- ◆ Morötesi (UV) ışık
- ◆ Çevresel kimyasallar: Hidrokarbonlar (özellikle sigarada bulunur), bazı bitkiler, mikrobiyal ürünler (afلاتoksinler gibi), kanser tedavisinde kullanılan kimyasallar bu grupta sayılabilir.

DNA hasarına neden olan hücre içi mekanizmalar şunlardır:

- ◆ Depürinasyon: Çekirdekli insan hücrelerinin her birinden baz-şeker bağının ayrılması ile günde yaklaşık 5000 A ya da G kaybedilir.
- ◆ Deaminasyon: Her gün yaklaşık 100 C kendiliğinden deamine olur ve U' ya dönüşür. Daha az sıklıkla ise A deaminasyonu ile hipoksantin, G deaminasyonu ile de ksantin oluşur.
- ◆ Reaktif oksijen türleri.
- ◆ Replikasyon ya da rekombinasyon hataları (44).

2.2.2. DNA Onarım Mekanizmaları

DNA'da oluşan hatalar sonrasında hücre yaşamaya devam ederse bu hatalar düzeltilir. Bunun için gerekli 130 kadar protein farklı mekanizmalar ile DNA onarım sisteminde görev yapar. DNA onarım genlerinde oluşan somatik mutasyonlar sonrasında farklı klinik durumlar ortaya çıkar (Tablo 2.6).

Tablo 2.6. DNA onarım genlerinde meydana gelen somatik mutasyonlar sonrası oluşan hastalıklar (45)

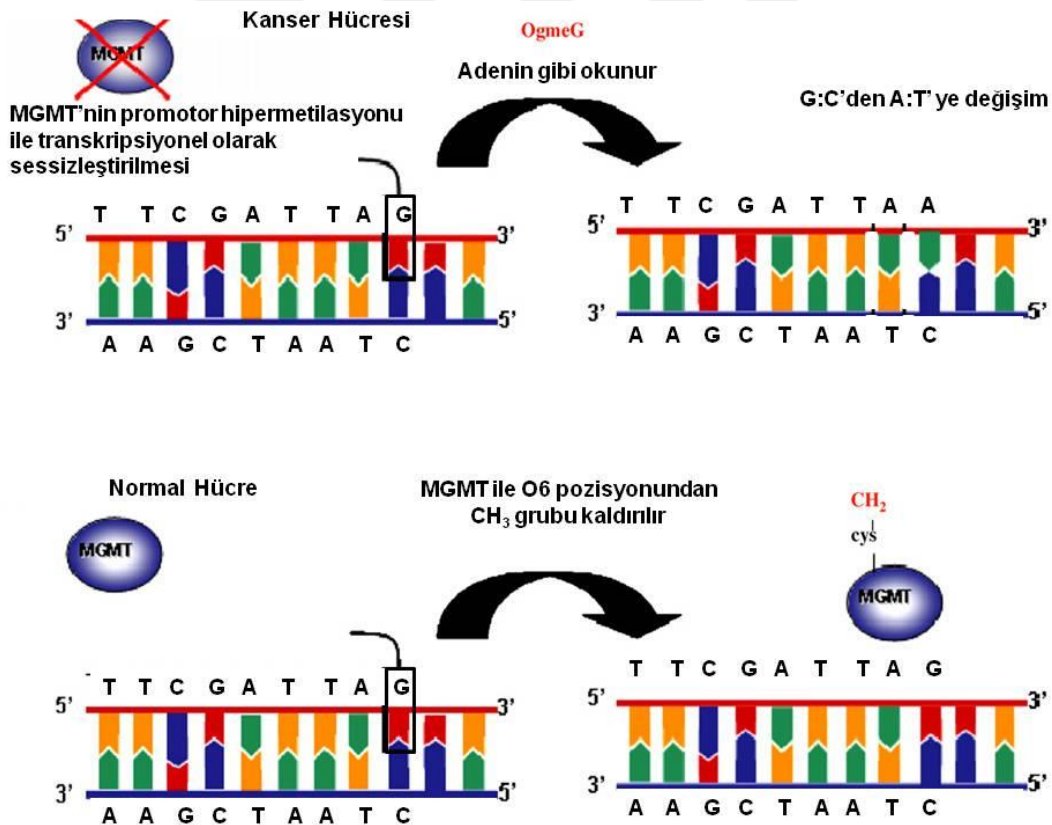
<i>İsim</i>	<i>Fenotip</i>	<i>Etkilenen Enzim ya da Yolak</i>
<i>MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2</i>	<i>Kolon Kanseri</i>	<i>MMR</i>
<i>Xeroderma pigmentozum</i>	<i>Deri Kanseri, Hücresel UV duyarlılığı, nörolojik bozukluklar</i>	<i>Nükleotid çıkarma Onarımı ("Nucleotide excision repair", NER)</i>
<i>Xeroderma Pigmentozum Varyantı</i>	<i>Hücresel UV duyarlılığı</i>	<i>DNA polimeraz δ' nin yaptığı transkripsiyon sentezi</i>
<i>Ataksi-Telenjektazi</i>	<i>Lösemi, Lenfoma, Hücresel Gama ışını duyarlılığı, genom instabilitesi</i>	<i>ATM proteini (Çift zincir kırıkları ile aktive olan bir protein kinaz)</i>
<i>BRCA2</i>	<i>Meme ve over kanseri</i>	<i>Homolog rekombinasyon ile tamir</i>
<i>Werner Sendromu</i>	<i>Prematür yaşlanma, farklı bölgelerde kanserler, genom instabilitesi</i>	<i>Aksesuar 3' eksonükleaz ve DNA helikaz</i>
<i>Bloom Sendromu</i>	<i>Farklı bölgelerde kanserler, genom instabilitesi, Lösemi</i>	<i>DNA çapraz bağlanma onarımı</i>

DNA onarım mekanizmaları doğrudan onarım, baz çıkarma onarımı, nükleotid çıkarma onarımı ve yanlış eşleşme tamiri olarak dört grupta incelenebilir.

2.2.2.1. Doğrudan onarım

Çok sık kullanılmayan bu mekanizma için 3 farklı gen görev yapmaktadır. Bunlar içerisinde en iyi tanımlanan O⁶-Metil guanin-DNA metil transferaz (MGMT) enzimidir.

MGMT geni, 10. kromozom uzun kolu üzerinde yer almakta (10q26), normal hücre döngüsünün devamlılığında ve genomik stabilitenin korunmasında önemli rol oynamaktadır (46). Genin ürünü olan protein, yanlış metillenmiş guaninlerden metil gruplarını kaldırır. Guaninin O⁶ pozisyonunda alkilasyonu kanserde mutasyon oluşumunda önemli bir basamaktır (47). Nokta mutasyonu etkilerine ek olarak O⁶-metilguanin rezidüleri rekombinojenik ve sitotoksik etki gösterirler (48). Ek olarak, O⁶-kloretilguanin sitozin rezidülerinin karşılığında çapraz bağlanmaya neden olarak DNA replikasyonunu bloke eder (49). *MGMT*, alkil grubunu transfer eden doğrudan onarım yoluyla hücreleri bu hasardan korur (50). Yapılan çalışmalarda *MGMT* ifadenmesinin tümör hücrelerinde normal dokuya göre azaldığı ve bu durumdan sorumlu mekanizmanın *MGMT* geni promotor hipermetilasyonu olduğu belirlenmiştir (51, 52, 53, 54). Kanser hücresinde metillenmiş *MGMT*'nin işlev kaybederek mutasyon oluşumuna neden olması ve normal hücrede metillenmemiş *MGMT*'nin yanlış metillenmiş guaninlerden metil gruplarını kaldırması Şekil 2.3'te gösterilmiştir.

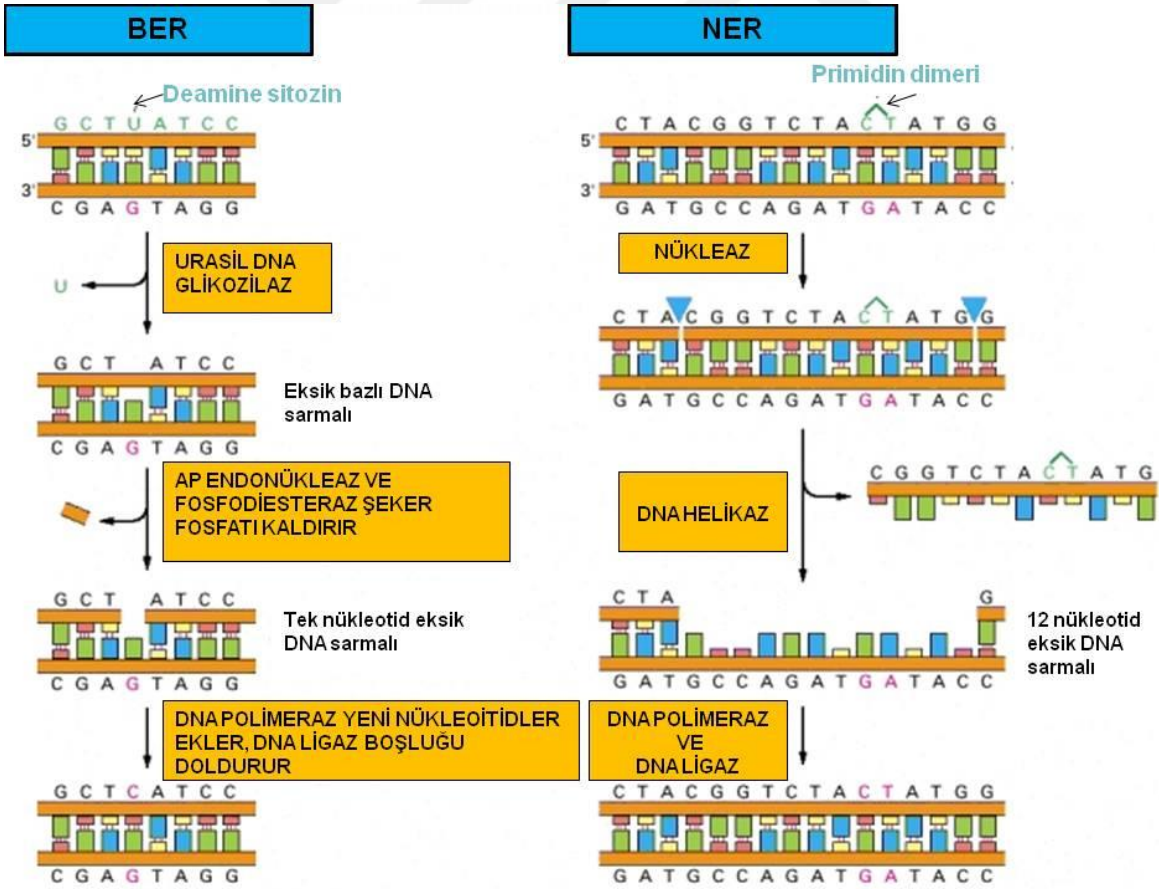


Şekil 2.3. Kanser hücresinde metillenmiş *MGMT*'nin işlev kaybederek mutasyon oluşumuna neden olması ve normal hücrede metillenmemiş *MGMT*'nin yanlış metillenmiş guaninlerden metil gruplarını kaldırması (55).

2.2.2.2. Baz çıkarma onarımı (“*Base excision repair*”, BER) ve Nükleotid çıkarma Onarımı (“*Nucleotide excision repair*”, NER)

BER sistemi ile en sık görülen DNA hasarları düzeltilir. İnsanlarda farklı DNA glikozilazları kodlayan en az sekiz gen vardır. Her biri özelleşmiş şekilde baz hasarını tanır ve düzeltir. Hatalı bazın endonükleaz ile kaldırılmasının ardından kayıp bazın bulunduğu pozisyonda bir fosfodiesteraz şeker fosfat köprüsünü keser ve şeker fosfat kalıntısını kaldırır. Boşluk ise DNA polimerazın yeniden sentezi ile doldurulur ve DNA ligaz ile birleştirilir. Benzer mekanizma spontan depürinasyonda da kullanılır (56).

NER ile, BER’ den farklı olarak hasarın çevresindeki geniş bir alan da kaldırılır. Otozomal resesif bir hastalık olan Kseroderma Pigmentozum’da bu mekanizma bozulmuştur ve DNA hasarı tamir edilemediğinden fenotip hücrel UV duyarlılığı olarak karşımıza çıkar (56). İki önemli DNA onarım mekanizması olan BER ve NER’in karşılaştırılması Şekil 2.4’te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. BER ve NER’in karşılaştırılması (45)

2.2.2.3. Yanlış eşleşme tamiri

Birçok yanlış eşleşmiş baz DNA polimerazın kendi hatalarını düzeltme aktivitesi ile uzaklaştırılır. Gözden kaçanlar ise daha sonra yeni sentezlenmiş DNA'yı tanıyan MMR sistemi ile onarılır. MMR sistemi, genomik kararlılığın korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Diğer DNA onarım sistemlerinde olduğu gibi MMR sistemi öncelikle *E. coli*'de tanımlanmıştır. *E. coli* 'de MMR sistemi yeni sentezlenen DNA'yı bu iplikteki GATC dizilerinde bulunan adeninlerin metillenerek 6-metil guanin oluşturması esasına göre tanır. Yeni sentezlenen zincirde metilasyon görülmez (45). MMR sisteminde görevli proteinlerin *E. Coli*'de ve insandaki homologları ve fonksiyonları Tablo 2.7'de gösterilmiştir.

Tablo 2.7. MMR sisteminde görevli proteinlerin *E. Coli*'de ve insandaki homologları ve fonksiyonları (57)

<i>E. coli</i>	İnsan	Fonksiyon
MutS	hMutS α (<i>MSH2-MSH6</i>) hMutS β (<i>MSH2-MSH3</i>)	DNA yanlış eşleşme ve hasar tanınması
MutL	hMutL α (<i>MLH1-PMS2</i>) hMutL β (<i>MLH1-PMS1</i>) hMutL γ (<i>MLH1-MSH3</i>)	Endonükleaz, yanlış eşleşme ile uyarılan çıkarımın sonlandırılması
MutH	?	Zincir ayrılması
UvrD	?	DNA helikaz
ExoI, ExoVII, ExoX, RecJ	<i>ExoI</i>	Yanlış bazın çıkarılması
Pol III Holoenzim	<i>Pol δ</i> <i>PCNA</i>	Yeni DNA sentezi MMR başlaması, Yeni DNA sentezi
SSB	<i>RPA</i> <i>HMGB1</i> <i>RFC</i>	Yanlış baz çıkarımının uyarılması Yanlış eşleşme ile uyarılan çıkarımın sonlandırılması
DNA Ligaz	DNA Ligaz I	Çentik onarımı

Biyokimyasal ve genetik çalışmalar ile protein ürünlerinin DNA MMR sistemi için gerekli olduğu en az altı gen (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MLH3*, *PMS2* ve *MSH3*) tanımlanmıştır.

MLH1 geni herediter nonpolipozis kolon kanserinde sıklıkla mutasyona uğrayan bir bölge olarak belirlenmiştir. *E. coli*'de MutL geninin insandaki homologu olan bu gen 3p21.3'te yerleşmiştir ve herediter nonpolipozis kolon kanserinde mikrosatellit dizilerinde karakteristik değişiklikler ile ilişkili bulunmuştur. Değişik transkript varyantları tanımlanmakla birlikte henüz tüm nitelikleri ortaya konmamıştır (58). *MLH1* geninin metilasyonu ile gen ifadelemesinin azaldığı ve ek olarak da metilasyonun tümör ilerlemesi ve gelişimi ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (59, 60).

MSH2 ise yine herediter nonpolipozis kolon kanseri ile ilişkisi gösterilen ve mikrosatellit instabilitesine yol açan diğer bir MMR genidir. 2p21'de lokalize olan bu genin *E. coli*'de homologu mutS olarak bildirilmiştir (58). *MHS2* geninde belirlenen germ-line mutasyonlar herediter polipozis olmayan kolon kanseri ailelerinde gösterilmiştir (61). Yapılan çalışmalar nonpolipozis kolon kanseri ile ilişkili mutasyonların %90'ının *MLH1* ve *MSH2* genlerinde gösterildiğini bildirmiştir (62).

E. coli'de MutS proteinine benzer bir protein kodlayan diğer bir gen ise *MSH6*'dır. MutS proteini yanlış eşleşmiş proteinlerin tamir edilmek üzere tanınmasını sağlar. MutS homologlarında yaklaşık 150 a.a.'ten oluşan yüksek oranda korunmuş "Walker-A adenine nucleotide binding motif" diye adlandırılan bölge bulunur. *MSH6*'nın ürünü olan protein *MSH2* ile birlikte ADP ve ATP değişimi sağlayarak, bir moleküler kavşak gibi çalışan yanlış eşleşme tanıma kompleksi oluştururlar. Bu gendeki mutasyonlar herediter nonpolipozis kolon kanseri ve endometriyum kanserinde tanımlanmıştır (58).

MutL homolog gen ailesinin bir diğer üyesi olan *MLH3* geni 14q24.3'te lokalizedir. MLH genlerinin tümü DNA replikasyonu ve takibinde mayotik rekombinasyon sürecinde genomik kararlılığın korunmasını sağlar. *MLH3* proteini diğer aile üyeleri ile birlikte bir heterodimer gibi çalışır (58). *MLH3* genindeki somatik mutasyonlar sıklıkla mikrosatellit instabilitesi sergileyen tümörlerde karşımıza çıkarken germ-line mutasyonlar herediter nonpolipozis kolon kanserinde bildirilmiştir (63).

Kromozom 7 üzerinde yerleşmiş *PMS2* geni DNA yanlış eşleşme tamiri ile ilgili başka bir genidir. Gen ürünü olan protein MLH1 ile bir heterodimer oluşturur ve bu kompleks yanlış eşleşmiş bazlara bağlanır (58). Bu gendeki mutasyonlar sonucu herediter nonpolipozis kolon kanseri, Turcot Sendromu ve supratentoryal primitif nöroektodermal tümörler oluşur (63).

MutS beta homologu olarak bilinen ve MSH2 ile heterodimer oluşturarak replikasyon sonrası DNA MMR sisteminin bir parçası olarak görev yapan *MSH3* geni 5q11-12 bölgesinde lokalize olup, mutasyonları endometrium kanserinin bir sebebi olarak belirlenmiştir (58).

2.3. EPİGENETİK

Klasik genetik bilgiler ile fenotipte gözlenen çeşitlilik her zaman açıklanamamaktadır. Epigenetik, DNA dizisinde kalıtılabilir değişiklikler olmaksızın gen ifadenme ve fonksiyonun başlatılması ve sürdürülmesi ile ilişkili mekanizmalar olarak düşünülebilir. Aynı zamanda epigenetik için çevre ve genetik faktörler arasında bir aracı olduğu söylenebilir. (64).

2.3.1. Epigenetik Mekanizmalar

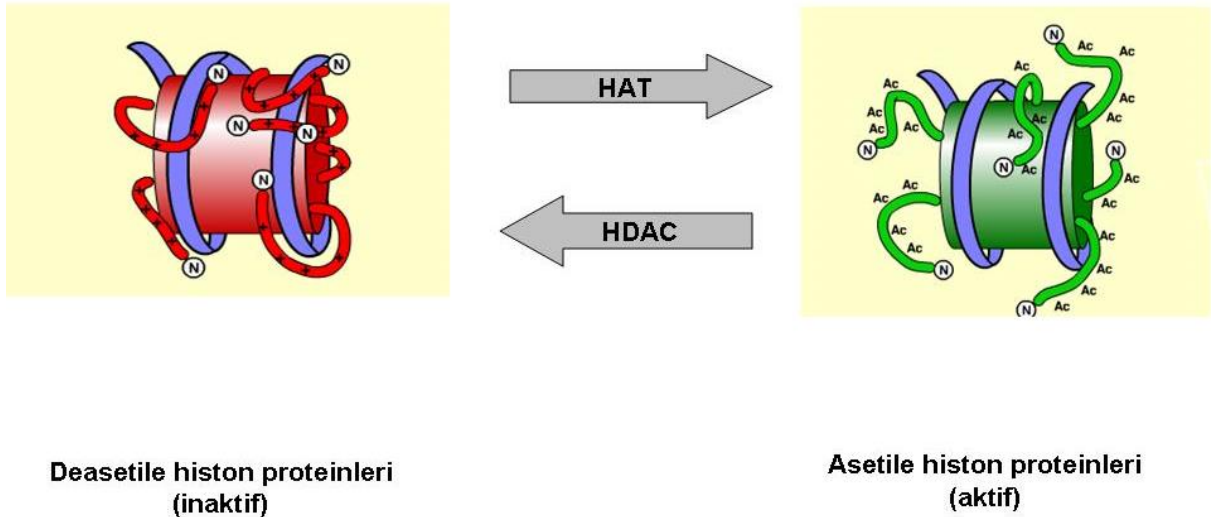
Epigenetik ağı çok katmanlı karmaşıklığın içerisinde üç mekanizma ile özetlenebilir.

2.3.1.1. Histon modifikasyonları

DNA nükleozom formunu alabilmek için histon proteinleri ile sarılı halde bulunur. Her nükleozom H3 ve H4 dimerleri ile çevrili iki adet histon 2A ve iki adet histon 2B tetramerinden oluşur (65). Birbirini izleyen iki nükleozom bağlayıcı histon (H1) ile birbirine bağlanmıştır. Bu bağlayıcı histonların bolluğu ile kromatin yerleşimi arasında oldukça kuvvetli bir ilişki vardır. Gen ifadenmesi sırasında histon proteinleri ile DNA molekülü arasındaki paketlenme yeniden modellenme denilen değişikliğe uğrayarak buna

imkan verir. Histon proteinlerinin amino ucunda asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikutinasyon, ADP ribozilasyon ve sumoylasyon gibi çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlar görülmektedir. Bu modifikasyonların histonların elektrostatik yükünü etkilemesi ile kromatin yapısını değiştirdiği ve sonrasında histon-DNA ve histon-histon ilişkisi etkileyerek, DNA paketlenmesi, replikasyonu, tamiri ve gen ifadenmesi gibi birçok biyolojik olayı kontrol ettiği bilinmektedir (66, 67, 68, 69)

Histon modifikasyonları içerisinde en iyi bilineni asetilasyondur. Histonların asetilasyonu histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzim aileleri tarafından düzenlenmektedir (Şekil 2.5). Negatif yüklü asetil grubunun histon proteininin amino ucuna takılmasıyla pozitif yüklü lizin aminoasiti yükünü kısmen kaybetmekte, kromatinde gevşeme meydana gelmekte, transkripsiyon faktörlerinin genlerin promotor bölgelerine ulaşmaları kolaylaşmakta ve bu sayede transkripsiyon gerçekleşmektedir. Asetilasyon geri dönüşümlü olarak gerçekleşen bir olaydır. Lizin aminoasitinden asetil grubunun çıkartılmasıyla kromatin tekrar kondanse olmakta ve transkripsiyon baskılanmaktadır. Kromatinin belli bir bölgesinde histonların asetile olması, o bölgenin transkripsiyonel açıdan aktif olduğunu gösterirken, deasetile olması transkripsiyonun baskılandığını göstermektedir (70).



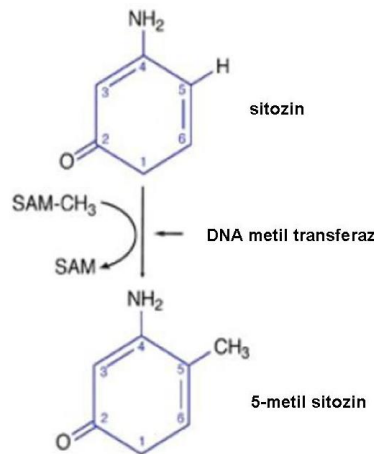
Şekil 2.5. İnaktif haldeki deasetile histon proteinlerinin HAT enzimi ile aktif formu olan asetile hale getirilmesi ve aynı reaksiyonun HDAC enzimi ile tersi yönünde gerçekleştirilmesi

2.3.1.2. *Micro* RNA' lar

Küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardan olan "microRNA" (miRNA) yaklaşık 21-23 nükleotid uzunluğunda tek iplikli bir RNA molekülüdür ve gen ifadenmesinin düzenlenmesinde rol oynar. miRNA'lar kodlamayan RNA'lardandır, yani DNA'dan transkripsiyonu yapılan ama proteine çevrilmeyen genler tarafından kodlanırlar. Pri-miRNA olarak adlandırılan primer transkriptler işlenerek, önce pre-miRNA adlı kısa yapılara, sonra da fonksiyonel miRNA'ya dönüşürler. Olgun miRNA moleküller bir veya daha çok mesajcı RNA (mRNA) ile kısmi tamamlayıcıdır ve başlıca işlevleri gen ifadesini ayarlamaktır (71).

2.3.1.3. DNA Metilasyonu

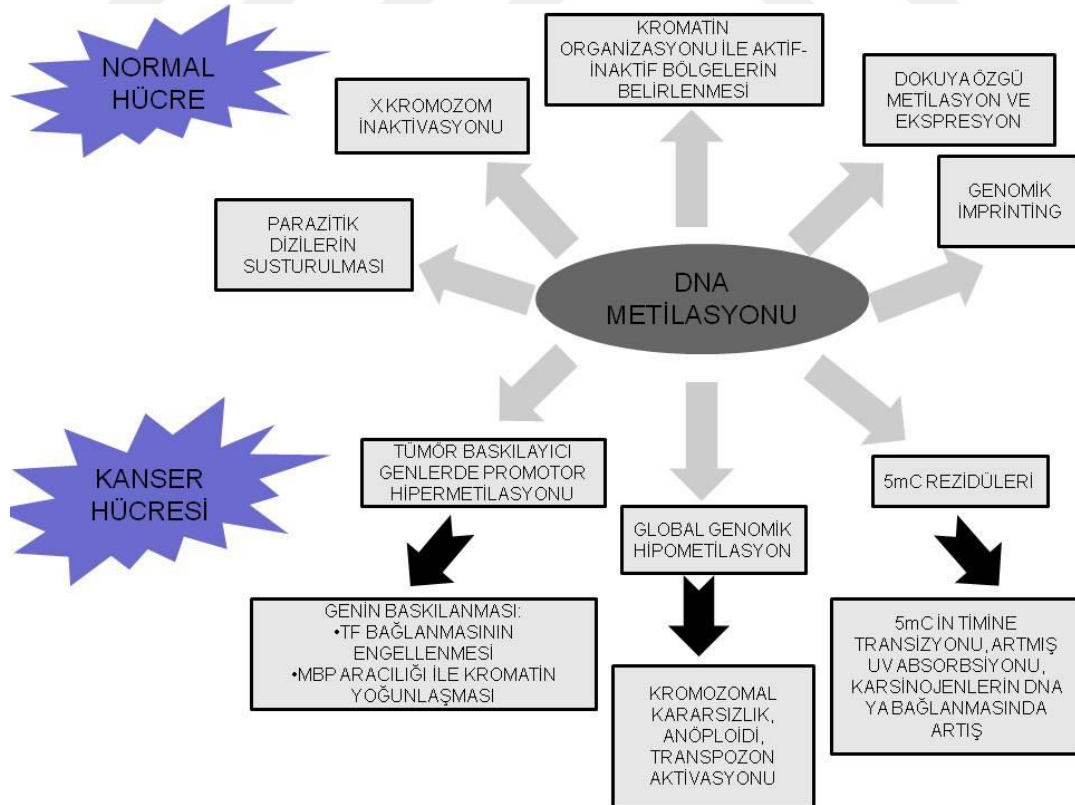
DNA'nın metillenmesi, omurgalılarda transkripsiyonun kontrolünde kromatin yapısı ile ilişkili genel bir mekanizmadır. İnsan DNA'sında metilasyon CpG olarak adlandırılan guaninin önüne yerleşmiş sitozinlerde meydana gelir (72). DNA metilasyonunda görevli olan DNA Metil Transferaz (DNMT) enzimleri; DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L olmak üzere beş tanedir. DNMT1 yarı metillenmiş DNA'yı tam metilleyen ve metilasyonun idamesinden sorumlu olan en önemli enzimdir. DNMT3a ve 3b ise embriyonik hücrelerde yoğun olarak ifadenmekte ve *de novo* metilasyonda görev almaktadırlar. Metilasyon esnasında metil kaynağı olarak organizmadaki genel metil verici olan S-adenozil metiyonin (SAM) kullanılmaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. SAM varlığında DNA metil transferaz ile sitozin'den 5-metil sitozin oluşumu

Genomda 16 farklı dinükleotid olasılığı bulunmaktadır (AA, AT, AC, AG, TT, TA, TC, TG, CC, CA, CT, CG, GG, GA, GT, GC). Bu dinükleotidlerden biri olan CpG dinükleotidi tüm genomun yaklaşık %1' ini oluşturmaktadır. CpG dinükleotidi oranının insan genomunun evrimi sırasında 'CpG supresyonu' olarak adlandırılan bir fenomenle başarılı bir şekilde azaltıldığına inanılmaktadır. CpG bölgeleri genom içerisinde rastgele dağılmaz ve CpG adacıkları olarak da bilinen CpG zengin bölgeler birçok genin düzenleyici bölgelerinin 5' ucuna yerleşmiştir. DNA metilasyonunun dokuya özgü ve germ-line genlerin kontrolünde önemli bir basamak olduğu bilinmektedir (73).

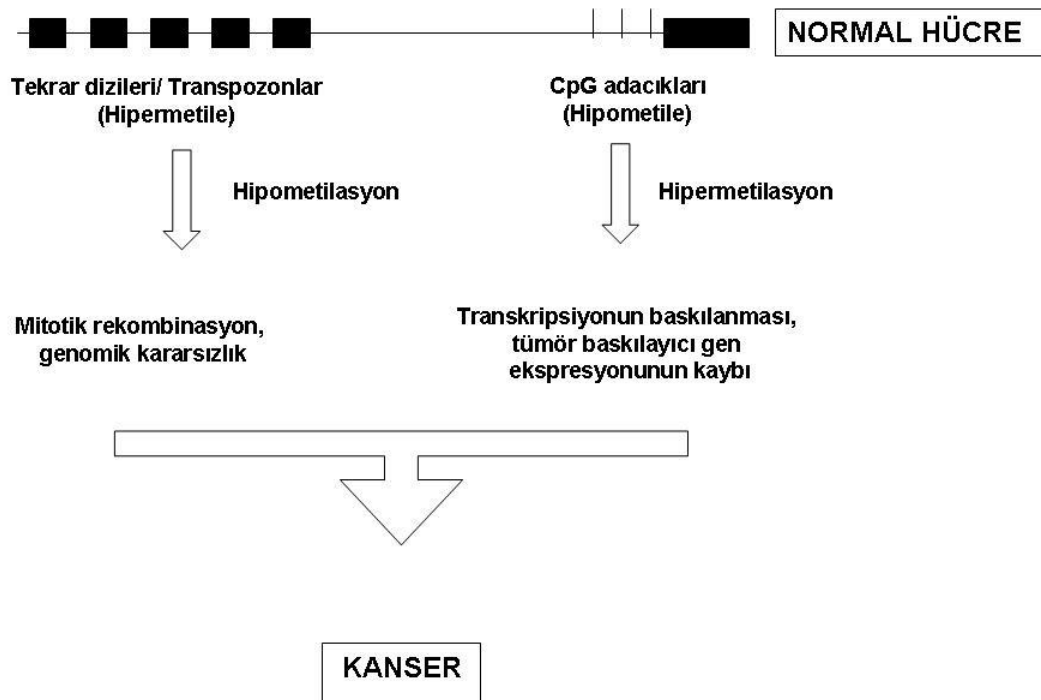
Genomik imprinting sırasında iki parental allelden birinin monoallelilik ifadenmesi için de DNA metilasyonu gereklidir (74). Ayrıca kadınlarda X inaktivasyonu da aynı mekanizma ile sağlanmaktadır. Tekrarlayan DNA dizilerinin hipometilasyonu "transposable" DNA dizilerinin tekrar aktivasyonu ile kromozomal instabiliteye, translokasyonlara ve genin yapısının bozulmasına neden olabilir (45). Genellikle CpG metilasyonu genin sessizleştirilmesi ile ilişkilidir. DNA metilasyonu gen ifadenmesini farklı mekanizmalar ile inhibe edebilir (75). Normal hücrede ve kanser hücresinde DNA metilasyonunun sonuçları Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Normal hücrede ve kanser hücresinde DNA metilasyonunun sonuçları (76)

2.3.2. DNA metilasyonu ve kanser

DNA metilasyonu ve kanser ilişkisi uzun yıllardır bilinmekte ve bu konudaki çalışmalar çok sık karşımıza çıkmaktadır. Metilasyonun hem artması hem de azalması hücrede farklı mekanizmaları etkileyerek normal hücre döngüsünü kanser yönünde değiştirebilmektedir (76). DNA üzerinde hipo ve hipermetilasyonun meydana geldiği bölgeler ve kanseri oluşturan mekanizmalar Şekil 2.8’de özetlenmiştir.



Şekil 2.8. Hipo ve hipermetilasyonun meydana geldiği bölgeler ve kanseri oluşturan mekanizmalar (76)

2.3.2.1. Hipometilasyon ve Kanser

Normal dokulardaki karşılıkları ile kıyaslandığında genlerin metilasyon seviyelerindeki azalma insan tümörlerinde ilk olarak ortaya konmuş bir epigenetik değişikliktir (77). DNA hipometilasyonu ile kanser gelişimi arasındaki ilişkiyi açıklamada 3 farklı mekanizma öne sürülmüştür. Bunlar; kromozomal instabilite gelişimi, transposable elemanların reaktivasyonu ve imprinting kaybıdır (72). Metilasyonun kaybı öncelikle tekrarlayan DNA bölgelerinde hipometilasyon ve genlerin kodlayıcı kısımlarında ya da intronlarında

demetilasyon sonucu görülür. Tümör gelişim sürecinde iyi huylu oluşumdan malign dokuya doğru geçişte hipometilasyon seviyesi de artar (78).

2.3.2.2. Promotor Hipermetilasyonu ve Kanser

İnsan genomunda yaklaşık sayısının 20.000 olduğu tahmin edilen CpG adalarının %50-60'ının genlerin promotor bölgelerinde olduğu bilinmektedir. Birçok kanser türünde karşımıza çıkan temel mekanizma tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerinde bulunan CpG adacıklarında meydana gelen hipermetilasyondur. Bu mekanizma ile ilgili ilk araştırmalar *Rb1* geninin promotor bölge hipermetilasyonun gösterilmesi şeklindedir (79,80). Hücre döngüsü ve apoptoz gibi hücre yolaklara ek olarak tümör baskılayıcı genlerde ve DNA onarım genlerinde promotor hipermetilasyonu yolu ile genin susturulması bilinen bir mekanizmadır (81). Kansereleşme sürecinde promotor hipermetilasyonunun rolü erken evrelerde belirgin olarak göze çarpmaktadır. Promotor bölge hipermetilasyonu ile transkripsiyon faktörlerinin promotora bağlanmasını önleyerek genin susturulması sağlanır (82).

2.4. Metilasyon tarama yöntemleri

Genom üzerinde yer alan metilasyon bölgelerinin varlığının ya da konumunun tespiti için kullanılabilen yöntemlerin çeşitliliği ile doğru orantılı olarak çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Her yöntemin kendine özgü kullanım alanları ve uygulama biçimleri nedeniyle farklı yöntemlerin bir arada kullanımı da gündeme gelmektedir. Bu yöntemler ile tüm genomdaki DNA metilasyonunun derecesinin, spesifik bir dizideki DNA metilasyonu durumunun ya da yeni metilasyon noktalarının belirlenmesi mümkün olmaktadır (82).

2.4.1. Tüm genom metilasyon profilinin belirlenmesi

Tüm genomdaki metilasyon profilini belirlemek için kullanılan yöntemler yüksek performanslı ayırma yöntemleri ya da enzimatik/kimyasal uygulamalar kullanılarak yapılır. Örneğin, enzimatik hidroliz sonrasında elde edilen deoksiribonükleozidlerin Yüksek

Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-*High Performance Liquid Chromatography*) ile ayrıştırılması ve sitozin ve metil sitozinlerin absorbanslarının karşılaştırılması ile tüm genomda metilasyon durumu belirlenebilmektedir (82). Bir diğer uygulama da metil sitozin spesifik antikörlerin kullanıldığı *in situ* yöntemidir.

2.4.2. Spesifik DNA dizisinde metilasyon durumunun belirlenmesi

Belirli bir DNA dizisinde metilasyon profilinin belirlenmesi için kullanılan yöntemler bisülfidit bağımlı olan ve olmayan yöntemlerdir. Bisülfidit modifikasyonuna bağımlı olmayan yöntemlerin ortak özelliği DNA metilasyon paterninin baz modifikasyonu olmaksızın metilasyon duyarlı ve duyarsız restriksiyon enzimleri kullanılarak belirlenmesidir. En sık kullanılan metilasyon spesifik restriksiyon enzim izoşizomerleri HpaII/MspI'dir (82). *Southern blot* yöntemi ile kesim ürünleri jel elektroforezi ile ayrıştırmanın ardından nitroselülöz bir membran üzerine alınır ve işaretlenmiş probalar ile hibridize edilir. Ardından da otoradyografik yöntemlerle görüntülenir. Yöntemin kısıtlılıkları zahmetli olmasının yanında fazla miktarda DNA'ya ihtiyaç duymasındır. Bir diğer şekilde de enzim kesimi yapılmış örnekler polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılarak görüntülenir. Metilasyon spesifik enzim ile kesilen ürünlerde eğer metilasyon varsa kesim olmaz ve PZR ürünü görüntülenebilir. Bu yöntemin duyarlılığı metilasyon spesifik enzimlerin tanıdığı noktaların sınırlı olması nedeniyle düşüktür (82).

Bisülfidit modifikasyonuna bağımlı yöntemler de belirli bir DNA dizisinde metilasyon profilini belirlemek için kullanılır. Metillenmiş sitozin bisülfidit ile reaksiyona girmezken, bisülfidit metillenmemiş sitozini urasile çevirir. Bu reaksiyon metile olan ve olmayan DNA'nın tanınmasını sağlar. Başta metilasyona özgü PZR (MS PZR), DNA dizi analizi, Metilasyona özgü tek nükleotid primer uzaması (Ms-SNuPE-Methylationsensitive single-nucleotide primer extension), Kombine bisülfidit restriksiyon analizi (COBRA-Combined bisulphite restriction analysis) ve MethyLight olmak üzere bisülfidit modifikasyonu sonrası pek çok yöntem kullanılabilmektedir (83).

2.5. Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA)

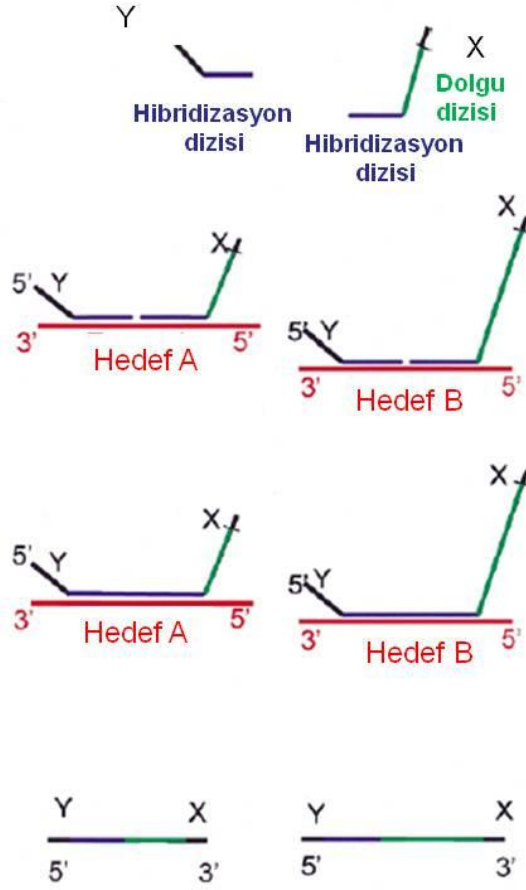
2.5.1. Genel bilgiler

MLPA ilk kez 2002 yılında Shouten ve arkadaşlar tarafından bildirilen PZR temelli bir mutasyon tarama yöntemidir. MLPA ile aynı reaksiyonda RNA veya DNA molekülünde 50 kadar kopya sayısı değişikliğinin tanımlanması mümkün olmaktadır. Sadece *thermal cycler* ve kapiller elektroforez cihazına gereksinim duyması sayesinde birçok laboratuvarında kullanıma girmiştir (84). Yöntem birbirini takip eden denatürasyon, hibridizasyon, ligasyon ve amplifikasyon aşamalarını gerektirmektedir. Probların hibridizasyonu için gerekli 16 saatlik süreyi de eklediğimizde işlemin uygulanması yaklaşık iki gün almaktadır.

2.5.2. MLPA probu özellikleri

MLPA yöntemini, ligasyon temelli diğer yöntemlerden ayıran özellik kullanılan prob kompleksidir. Her bir MLPA probu hedef dizi ile hibridize olduğunda ligasyona uğrayabilen iki oligonükleotid dizisi içerir. Ligate olmuş tüm problemlerin 5' ve 3' uçlarında tek bir primer çifti kullanılarak aynı anda amplifikasyonu sağlamak için tanımlayıcı diziler bulunur. Bu tanımlayıcı diziler sayesinde her bir prob ile uzunlukları 130 ve 480 b.ç. arasında değişen farklı amplifikasyon ürünleri elde edilir. (84).

MLPA probu kısa sentetik oligonükleotid ve uzun M13 kökenli oligonükleotid olmak üzere iki parçadan oluşur. Prob parçalarından ilki kimyasal olarak sentezlenmiştir ve 5' ucunda PZR ile amplifikasyon için ortak bir dizi ve de 3' ucunda da hedefe spesifik bir dizi içerir. *E. coli* M13 vektöründen elde edilen ikinci oligonükleotid ise 5' ucunda 25-43 nükleotid uzunluğunda ve ilk oligonükleotide komşu şekilde hedef diziyeye hibridize olan diziyi içerir. İkinci oligonükleotidin 3' ucunda PZR ile amplifikasyonda kullanılacak olan sabit dizi ve 19-370 nükleotid uzunluğunda dolgu dizisi bulunur. Bu dolgu dizisi ile farklı uzunlukta amplifikasyon ürünleri elde edilmesi sağlanır (Şekil 2.9) (84).



Şekil 2.9. MLPA probu ile iki farklı hedef bölgenin amplifikasyonu sonucu farklı uzunlukta ürün elde edilmesi (84)

Hibridize olmayan dolgu dizileri amplifikasyon ürünlerinin büyük bölümünün özelliklerinin bilinmesini sağlar. Hibridize olan kısa diziler ise mutasyon tespitinde avantaj sağlar. Çünkü mutasyon tespitinde probalar birbiriyle yarışmasız olarak hedef dizilerle eşleşirler. 200-500 ng DNA aralığında; MLPA sonuçları kullanılan DNA miktarından etkilenmez. Eğer 20 ng' dan az DNA kullanılırsa özgül olmayan amplifikasyon ürünleri gözlenebilir.

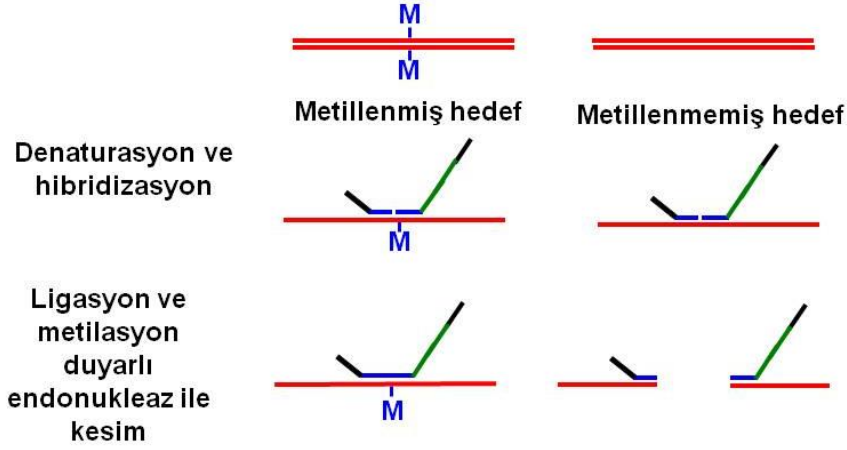
2.5.3. MLPA' nın kullanım alanları

Son yıllarda kullanıma girmiş bir yöntem olmasına rağmen uygulama kolaylığı nedeniyle MLPA birçok alanda kullanıma girmiştir. Bunlar;

- Küçük yeniden düzenlenmelerin tespiti
- Büyük kromozomal yeniden düzenlenmelerin tespiti (Williams Sendromu, Prader-Willi/Angelman Sendromları, DiGeorge sendromu, ... vb)
- Subtelomerik bölgelerdeki kopya sayısı değişikliklerinin tespiti
- Anöploidi tayini
- Tümör örneklerinde kromozomların kopya sayısı değişikliklerinin tespiti (ALL, KLL, oligodendroglioma, melanom, nöroblastom, vb.)
- Metilasyon tespiti
- Apoptozis ve inflamasyonda görevli genlerin mRNA analizleridir (85).

2.5.4. Metilasyon Spesifik MLPA (MS-MLPA)

MLPA'nın kopya sayısı değişikliklerini belirleme amaçlı kullanıma girmesinin ardından 2005 yılında MS-MLPA ilk kez Prader Willi ve Angelman sendromu tanılı olgulara ait örneklerde uygulanmıştır (86). Yöntemin esası klasik MLPA yöntemine benzer şekilde genomik DNA izolasyonunu takiben örneklerin tüm gece hibridizasyonun ardından ligasyonuna ve metilasyon spesifik enzimlerle kesimine dayanır. MLPA 24 adede kadar spesifik dizinin metilasyon profilinin değerlendirilmesini sağlar. MS-MLPA' da ligasyon işlemi ile birlikte aynı örneğin yarısı da Hha1 metilasyona özgü enzimi ile kesime uğrattılır. Eğer CpG dinükleotidi metile ise normal MLPA piki elde edilir. Eğer bölgede metilasyon yoksa, DNA-prob kompleksi metilasyona özgü restriksiyon enzimi ile kesilecek ve amplifikasyon ürünü gözlenmeyecektir. Hibridizasyon, ligasyon ve enzim kesim aşamalarından sonra PZR ile amplifikasyonda bütün problemler için tek çift primer kullanılmaktadır. Bu sayede birçok farklı gen ve bölgesinin metilasyon profili tek bir reaksiyonda değerlendirilebilir (86).



Sadece kesilmemiş (metile) ve ligasyona uğramış problemler amplifiye olur

Şekil 2.10. MS-MLPA yöntemi ile metillenmiş ve metillenmemiş hedeflerin gösterilmesi (86)

2.5.5. MS-MLPA yönteminin avantajları ve dezavantajları

MS-PZR promotor metilasyonunu belirlemede oldukça sık kullanılan bir metilasyon belirleme yöntemidir. Bu yöntemde promotor bölgede metilasyon olup olmamasına göre jel elektroforezinde metillenmiş ya da metillenmemiş ürünlerin görüntülenmesi sağlanır. MS-PZR ile metilasyonun belirlenebilmesi için tüm CpG dinükleotidlerinin metillenmiş olması gerekmektedir. CpG nükleotidlerinin çeşitliliği nedeniyle MS-PZR her zaman metilasyon profilini tam olarak göstermeyebilmektedir. MS-MLPA ile promotor dizilerdeki farklı CpG'lerin analiz edilebilmesi sağlanmaktadır ve dizi varyasyonlarına bağlı metilasyonun gözden kaçırılma ihtimali ortadan kalkmaktadır. Bisülfid uygulamalarına dayalı yöntemlerin zorluğunu ortadan kaldırmak amacıyla üretilmeye başlanan kitler ile yöntemin başarı oranı artmakla birlikte uygulama problemleri araştırmacıları sıkıntıya sokabilmektedir. Bisülfid uygulamasına gerek duymaması MS-MLPA'nın avantajları arasında sayılabilmektedir. Kanser araştırmalarında sıklıkla tercih parafin blok doku kesitleri, kolay ulaşılabilirliğinin yanında DNA izolasyonu sonrası özellikle iğne biyopsisi ile elde edilmiş dokularda yeterli konsantrasyonda DNA elde edilememesi nedeniyle sıkıntı yaratabilmektedir. Çalışılan DNA konsantrasyonunun az olması ile MS-MLPA parafin dokudan çalışma kolaylığı sağlaması ile de diğer

yöntemlerin önüne geçmektedir. MS-MLPA ile metilasyon profilinin belirlenmesi yanında gene ait kopya sayısı değişiklikleri ile ilgili de bilgi sahibi olunabilmektedir (87).

MS-MLPA yöntemi az miktarda DNA ile sonuç vermede başarılı olmasına rağmen iyi kalitede DNA'ya gereksinim duyması yöntemin kısıtlılığı olarak değerlendirilmektedir (85).

Moleküler ve/veya moleküler sitogenetik yöntemlerin aksine MLPA' nın henüz tek hücre değerlendirmesi için kullanıma uygun olmadığı üretici firma tarafında da bildirilmektedir. Tümör analizi sırasında tümörlü dokunun incelenen tüm dokunun en az %50 'si kadar olması gerektiği vurgulanmaktadır.

Avantaj ve dezavantajları göz önünde bulundurulduğunda MS-MLPA kolay uygulanabilir, maliyeti düşük ve çok fazla ekipman gerektirmeyen bir yöntemdir. Bu nedenle promotor metilasyon profilini göstermede son yıllarda kullanımı hızla artmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Yöntem

2000-2010 yılları arasında Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Histopatolojik olarak hepatosellüler karsinom tanısı alan 56 hasta ve 2007-2009 yılları arasında karaciğer nakil vericisi olmaları nedeniyle yapılan ince iğne aspirasyon biyopsisi sonrasında normal karaciğer dokusu tanısı alan 14 sağlıklı bireye ait arşiv materyalleri çalışma kapsamında incelendi. Hasta bireylerden örnekler; ince iğne biyopsisi, eksizyonel biyopsi, *wedge* biyopsi ve hepatektomi yöntemlerinden biri uygulanarak standart prosedürlerle alındı. Patoloji Anabilim Dalı tarafından standart formalin ile fikse edilip parafine gömülmüş doku örneklerinden her bir hasta için 10 µ kalınlığında en az üç kesit alınarak Anabilim Dalımız Moleküler Genetik Laboratuvarı'na gönderildi. Olgulara ait yaş, cinsiyet, kan grubu, tanı anındaki AFP düzeyi, evre, uygulanan tedavi yöntemi gibi veriler geriye dönük dosya taramaları ile elde edildi. AFP değerleri için laboratuvarın normal sınırı olan 5,5 IU/ml'nin üzerinde olan örnekler yüksek kabul edildi.

3.1.1. Kullanılan Cihazlar:

Santrifüj Cihazı (Eppendorf AG-Almanya)
Minisantrifüj (Costar-ABD)
Isıtıcı blok (Eppendorf AG-Almanya)
Masüstü vorteks cihazı (Snijders-Hollanda)
Thermal Cycler (Applied Biosystems 2720-Singapur)
Ph metre (Consort P500-Belçika)
Buzdolabı (Arçelik-Türkiye)
Derin dondurucu (Arçelik-Türkiye)
Kapiller elektroforez cihazı (Applied Biosystems 310, ABD)
Distile su cihazı (Millipore- ABD)
Çeker ocak (Bilser - Türkiye)
Buz makinası (Electrolux -İtalya)
PZR kabini (UVP- ABD)
Su banyosu (Medingen W12-Almanya)

Spektrofotometre (Eppendorf, Almanya)

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar:

DNA izolasyon kiti (Qiagene- ABD)

SALSA MS-MLPA KIT ME011-Version A1 (Mrc-Holland, Hollanda)

HhaI restriksiyon enzimi (Fermentas- İngiltere)

Formamid (Applied Biosystems, ABD)

LIZ size standart (Applied Biosystems, ABD)

Ksilen (Merck, Almanya)

Etanol (Merck, Almanya)

3.1.3. Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler:

TE tampon

10 mM Tris-Cl, pH 7.5

1 mM EDTA

ATL ve AL tampon

Hazır çözeltiler içerisinde presipitat gözlenmesi durumunda 70 °C'de ısıtılarak çözüldü.

Tampon AW1

19 ml konsantre AW1 tampon içerisine 25 ml etanol eklenerek oda ısısında saklandı.

Tampon AW2

13 ml konsantre AW1 tampon içerisine 30 ml etanol eklenerek oda ısısında saklandı.

Kullanmadan önce çalkalanarak karıştırıldı.

3.1.4. DNA eldesi

Çalışmamızda, hepatosellüler karsinom tanısı almış patoloji örnekleri ve normal karaciğer dokularına ait formalin ile fikse edilmiş parafine gömülü doku örneklerinden DNA eldesi aşağıdaki basamaklar uygulanarak gerçekleştirildi.

3.1.4.1. Parafinin uzaklaştırılması

Parafine gömülü doku örneklerinden 10 µm'lik kesitler alınarak 1,5 ml tüplerin içine yerleştirildi. Dokunun üzerine 1 ml ksilen eklenerek kuvvetli bir şekilde 10 saniye vorteks yapıldı. Örnekler ksilen içerisinde yaklaşık 1 saat bekletildikten sonra en yüksek hızda 2 dakika santrifüj edildi. Tüplere 1 ml etanol (%96) eklendi ve vortekslenerek karıştırıldı. Böylece etanolün rezidüel ksileni uzaklaştırması sağlandı. En yüksek hızda 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı pelletin kalkmamasına dikkat ederek atıldı, Tüplerin ağzı açık olarak etanol tamamen uçuncaya kadar beklendi (yaklaşık 10 dakika, oda ısısında veya 37°C'de). Etanolün uzaklaşmaması durumunda tüpler çeker ocak çalıştırılarak içerisindeki alkol tamamen uzaklaşmıyaya kadar bekletildi.

3.1.4.2. Proteinaz K muamelesi

Etanolün uzaklaştırılmasından sonra prelizis işlemine başlandı. 180 µl ATL tampon tüpün içine eklendi ve 20 µl proteinaz K konularak tüpler vortekslendi. 56°C'de yaklaşık 16 saat ısıtıcı blok içerisinde inkübe edilerek örneğin tamamen çözünmesi beklendi. Daha sonra sıcaklık 90°C'ye yükseltilerek tüpler 1 saat daha bekletildi. Süre sonunda tüpler kısa süreli santrifüj edilerek kapakta buharlaşma sonucu biriken damlalar çöktürüldü. 200µl Tampon AL eklenerek kuvvetlice vortekslendi. Ardından 200 µl etanol eklenerek tekrar vorteksle kuvvetlice karıştırıldı ve gerektiğinde pipetaj yapılarak homojen bir karışım elde edilmesi sağlandı. Tüpler kısa süreli santrifüj edilerek kapakta biriken damlalar çöktürüldü. Karışım dikkatlice toplama tüpleri içindeki kolonlara aktarıldı. Kapakları kapatılarak örnekler 8000 *revolutions per minute* (rpm) hızında 1 dakika santrifüj edildi. Kolonlar temiz toplama tüpüne aktarıldı, kirli toplama tüpü ve içeriği atıldı. Çözeltinin filtreden tam olarak geçmediği örneklerde daha yüksek hızda tekrar santrifüj edildi. Kolona 500 µl Tampon

AW1 eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonlar temiz toplama tüpüne aktarıldı kirli toplama tüpü ve içeriği atıldı. Kolona 500 µl Tampon AW2 eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonlar temiz toplama tüpüne aktarıldı, kirli toplama tüpü ve içeriği atıldı. En yüksek hızda 3 dakika santrifüj edilerek filtre membranı tamamen kurutuldu. Kolon yeni bir 1,5' ml'lik, DNA'nın saklanacağı tüpe aktarıldı ve her hasta için oda sıcaklığına getirilmiş 80 µl TE tampon, membranın ortasına eklendi. Kapak kapatılarak 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra en yüksek hızda 1 dakika santrifüj edildi.

3.1.4.3. DNA miktarının belirlenmesi

Spektrofotometre cihazında “*blank*” değerinin belirlenmesi amacıyla her ölçüm öncesinde bir kez 80 µl steril distile su örneği cihaza okutuldu. Elde edilen DNA örneğinden 5 µl alınarak üzerine 75 µl distile su ilave edildi. Dilüsyon miktarlarının cihaza girilmesinden (5+75) sonra her örneğin DNA konsantrasyonu ve 260 ve 280 nm'deki absorbanları ölçülerek DNA konsantrasyonları ve kalitesi belirlendi. Kalan DNA örnekleri MS-MLPA reaksiyonlarında kullanılmak üzere -20 °C' de saklandı.

3.1.5. MS-MLPA

3.1.5.1. DNA Denatürasyonu ve hibridizasyon:

DNA örnekleri her bir reaksiyonda 150 ng DNA olacak şekilde, 5 µl hacminde TE tampon ile dilüe edildi. Örnekler 98 °C 'de 10 dakika bekletildikten sonra 25 °C' ye soğutuldu. Her bir örnek için 1.5 µl SALSA Probe karışımı ve 1.5 µl MLPA Tampon içerecek biçimde karışım hazırlandı. 25 °C' deki örneklerin her birine bu karışımdan 3 µl ilave edilerek pipetle karıştırıldı. 95 °C' de 1 dakika inkübe edilen örnekler daha sonra 60 °C'de 16 saat bekletildi.

3.1.5.2. Ligasyon ve Metilasyon spesifik enzim ile kesim:

Her örnek için oda sıcaklığındaki Ligaz Tampon A'dan 3 µl alınarak 10 µl distile su ile karıştırıldı. Hibridizasyon yapılan her örnek tüpüne 13 µl ilave edildi. Her örnek için ikinci bir tüp hazırlandı. Toplam karışımdan 10 µl alınarak ikinci tüpe ilave edildi. Her örnek için Ligaz-65 karışımı ve Ligaz-Digestion karışımı hazırlandı.

Ligaz-65 karışımı

1.5 µl Ligaz-65 Tampon B

8.25 µl distile su

0.25 µl Ligaz-65 enzim

Ligaz-Digestion karışımı

1.5 µl Ligaz-65 Tampon B

7.75 µl distile su

0.25 µl Ligaz-65 enzim

0.5 µl, 10U/ µl, HhaI Restriksiyon enzimi

Her örneğe ait enzim kesimi yapılmış ve yapılmamış iki tüp hazırlanarak 49 °C'de en az bir dakika bekletildikten sonra Ligaz-65 karışımı ve Ligaz-Digestion karışımı her bir tüpe 10 µl ilave edildi ve pipetle karıştırıldı. Örnekler 49 °C'de 30 dakika inkübe edildi ve 98 °C'de 5 dakika bekletildi.

3.1.5.3. PZR Reaksiyonu:

PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere her örnek için iki tüp hazırlandı. Enzim kesimi yapılmış ve yapılmamış ligasyon ürünlerinden her bir örnek için 5 µl tüplere pipetlendi. Her örnek için 2 µl SALSA PZR Tampon ve 13µl distile su eklendi.

Deneyin bundan sonraki aşamaları buz üzerinde hazırlandı.

Polimeraz karışımı

1 µl SALSA PZR -primer

1 µl SALSA enzim Dilüsyon Tamponu

2.75 µl distile su

0.25 µl SALSA polimeraz

Tüpler buz üzerine alınarak her tüpe 5 µl polimeraz karışımı eklendi. Tüpler *termal cykler'* a yerleştirildi ve toplam hacim 25 µl olarak ayarlanarak PZR reaksiyonu başlatıldı

PZR koşulları

95 °C 30 sn. }
60 °C 30 sn. } 35 döngü
72 °C 60 sn. }

72 °C 30 sn.

3.1.5.4. ABI 310 Cihazına Yükleme ve Denatürasyon:

PZR reaksiyonu takiben elde edilen amplifikasyon ürünleri kapiller elektroforez için cihaza yüklendi. Her bir örnek için 0,5 ml'lik septalı tüplere 0,5 µl LIZ500 size standart, 13,5 µl deiyonize formamid ve 0,75 µl PZR ürünü ilave edilerek pipetajla homojenize edildi. Örnekler 80 °C'de 2 dakika denatüre edildikten sonra buz üzerine alındı. ABI 310 cihazında; 60 °C'de 1,5 kV ve 15 saniye injeksiyon zamanı ile 30 dakika yürütüldü. Elde edilen piklerin ürün boyları ve pik alanları Gene Scan analiz programı ile değerlendirildi.

3.1.5.5. SALSA MS-MLPA ME011-A1 MMR kit özellikleri

ME011-A1 MMR prob karışımı DNA onarım sisteminde yer alan yedi genin değişmiş metilasyon profilini göstermek amacıyla *MLH1* için beş, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *MSH3* için üç, *MLH3* için bir ve *MGMT* promotor bölgesi için üç prob içerir. Kitin içeriğinde hedef

dizinin metilasyon durumu ile ilgili bilgi vermek üzere HhaI kesim bölgesi içeren 21 prob bulunmaktadır. Ek olarak 11 referans prob da enzim kesim bölgesi içermeyen kontrol problemleridir. Metilasyon profilinin belirlenmesi yanında problemler analiz edilen örneklerde kopya sayısı değişiklikleri ile ilgili de bilgi vermektedir. Metilasyon değişikliklerinin belirlenmesi amacıyla kitin kullanımı sırasında metilasyon seviyeleri dokular arasında farklılık gösterebileceğinden aynı dokuya ait örneklerin karşılaştırılması ve hatta aynı yöntemle DNA izolasyonunun yapılması önerilmektedir.

MLH1 problemlerine içerisinde HhaI enzim kesim noktası olan beş prob bulunmaktadır. Bunlardan ikisi *MLH1* ifadenmesi için en kritik bölgeler olan C (transkripsiyon noktasından önce -248 -178 nükleotidler arasında) ve D (-9, +5 nükleotidler arasında) bölgelerini içermektedir. 166 ve 198 baz çifti uzunluğunda ürün veren bu iki probun mRNA ifadenmesini göstermek açısından en önemli problemler olduğu düşünülmektedir.

3.1.5.6. Veri analizi

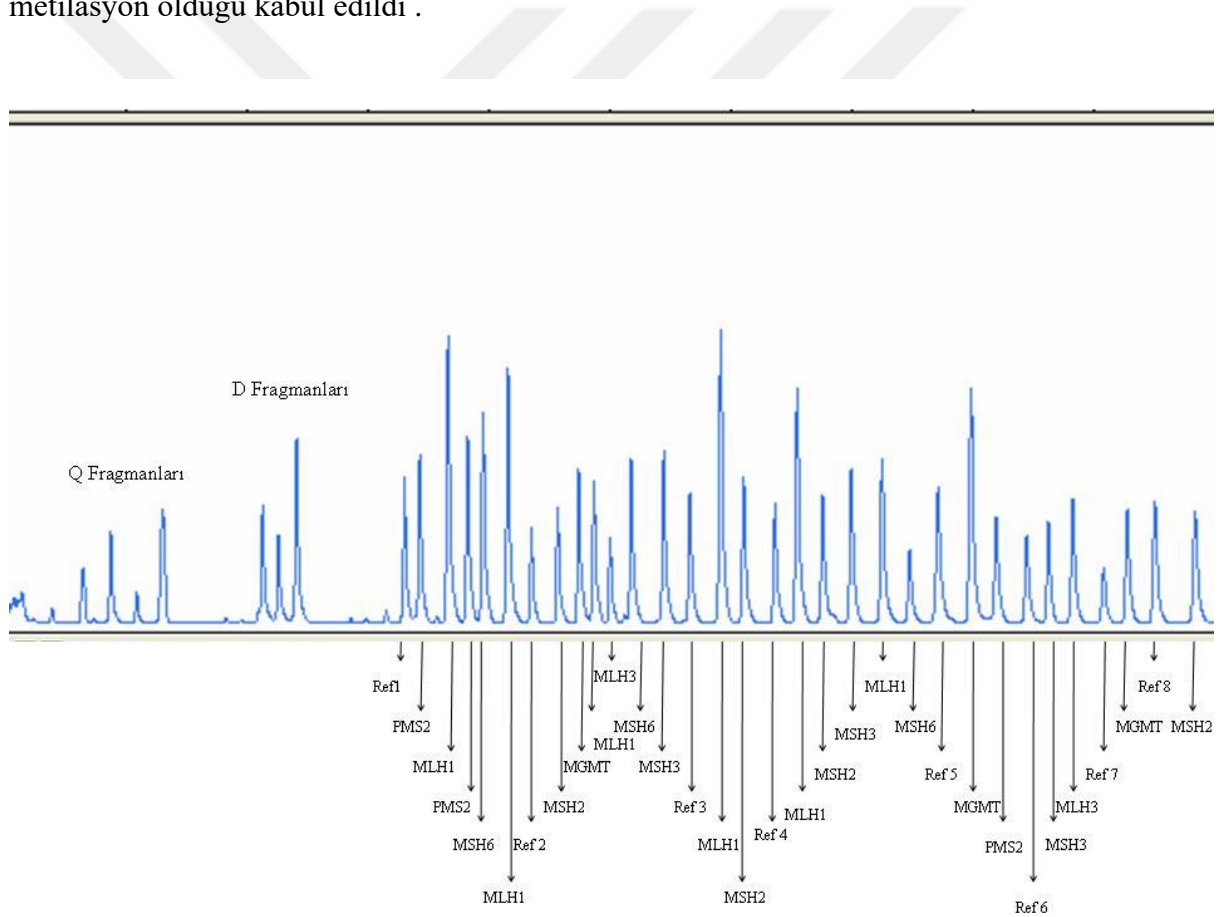
ME011-A1 MMR prob karışımı amplifikasyon ürünleri 136-400 b.ç. arasında değişen 32 farklı prob içerir. Bu problemlerin 11'i HhaI restriksiyon enzim kesim noktası içermezken (referans prob) diğer 21'i HhaI restriksiyon enzim kesim noktası içerir. Ek olarak prob karışımı, amplifikasyon ürünleri 120 b.ç.'den küçük yedi tane kontrol fragmanı bulundurur. Q-fragmanları dört (64-70-76-82 b.ç.) tanedir ve DNA kalitesinin kontrolünü sağlar. D-fragmanları ise üç tanedir (88-92-96 b.ç.) ve DNA denaturasyonunun kontrol edilmesini sağlar. Çalışmamızda kapiller elektroforez sonrasında D ve Q fragmanları ile reaksiyonun uygunluğu değerlendirildi (Şekil 3.1). Uygun olmayan örnekler için kapiller elektroforez ya da gerektiğinde PZR işlemleri tekrarlandı.

Her örnek için metilasyon ve kopya sayısı oranlarını belirlemek amacıyla problemlerden elde edilen piklerin alanları Excel programı ile analiz edildi. Enzim kesim noktası içermeyen problemlerden elde edilen pik alanlarının toplamı kontrol olarak kullanıldı.

Enzim kesimi yapılmış örneklerden elde edilen piklerin her birinin alanı kontrol problemlerin alanları toplamına bölünerek "Metilasyon (M)" değeri elde edildi.

Kesim yapılmayan örnekler için her bir probun pik alanı o örnek içerisindeki kontrol problemlerinin alanları toplamına bölünerek “Kopya Sayısı (KS)” değeri elde edildi. Kontrol ve hasta grubundaki her örnek için M ve KS değerleri birbirine oranlanarak 0-1 arasında beklenen bir metilasyon oranı elde edildi. Kontrol grubu ortalaması sıfır olan problemler değerlendirme dışında bırakıldı.

Her bir prob için kontrol grubu örneklerinden elde edilen metilasyon oranlarının ortalaması alınarak ortalamanın üzerinde olan değerler anlamlı olarak kabul edildi. *MLH1*, *PMS2*, *MSH6*, *MSH2*, *MGMT* ve *MSH3* gen bölgeleri için iki ve daha fazla anlamlı metilasyon değeri olan örnekte metilasyon olduğu kabul edildi. *MLH3* bölgesi için kesim bölgesi olan tek prob olduğundan kontrol grubu ortalamasının üzerinde olan hasta örneklerinde metilasyon olduğu kabul edildi .



Şekil 3.1. Kesilmemiş örneğe ait Q- D fragmanları, prob bölgelerine ait pik görüntüleri

Tablo 3.1. SALSA MS-MLPA ME011-A1 MMR kitine ait problemlerin ürün uzunlukları, kesim bölgesi varlığı ve kromozomal pozisyonları

Uzunluk (b.ç.)	MLPA Probu	Kesim bölgesi	Kromozomal pozisyon
64-70-76-82		Q fragmanları: DNA miktarını gösterir	
88-92-96		D fragmanları: Denatürasyonu gösterir	
136	Referans (CREM)	yok	10q12.1
142	PMS2	Var	7p22
148	MLH1	Yok	3p22.1
154	PMS2	var	7p22
160	MSH6	var	2p16
166	MLH1	var	3p22.1
175	Referans (TNFRSF1A)	yok	12p13.31
184	MSH2	var	2p21
193	MGMT	var	10q26
198	MLH1	var	3p22.1
202	MLH3	yok	14q24.3
209	MSH6	var	2p16
220	MSH3	var	5q14.1
229	Referans (PAH)	yok	12q23
237	MLH1	var	3p22.1
246	MSH2	yok	2p21
256	Referans (BCL2)	yok	18q21.3
265	MLH1	var	3p22.1
274	MSH2	var	2p21
283	MSH3	var	5q14.1
292	MLH1	var	3p22.1
301	MSH6	var	2p16
310	Referans (CDK6)	yok	16q22.1
319	MGMT	var	10q26
328	PMS2	var	7p22
337	Referans (CDH1)	yok	16q22.1
346	MSH3	var	5q14.1
355	MLH3	var	14q24.3
364	Referans (AI651963)	yok	10p14
373	MGMT	var	10q26
382	Referans (TSPAN15)	yok	10q22
400	MSH2	var	2p21

3.1.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi PASW (*Predictive Analytics Software*) paket programı ile yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sürekli veriler için ortalama \pm standart sapma, kategorik veriler için ise gözlem sayısı ve (%) olarak ifade edildi. Metillenme üzerinde etkili olabileceği düşünülen risk faktörlerine ilişkin Odds Oranları, %95 güven aralıkları ve anlamlılık düzeyleri Ki-kare testi ile hesaplandı.



4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen iki (%3,6) kadın, 54 (%96,4) erkek, toplam 56 hastanın yaşlarının ortalaması $58,63 \pm 13,015$ olarak bulunmuştur. Belirlenen yaş gruplarına göre rastlanma sıklıkları ve yüzdeleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

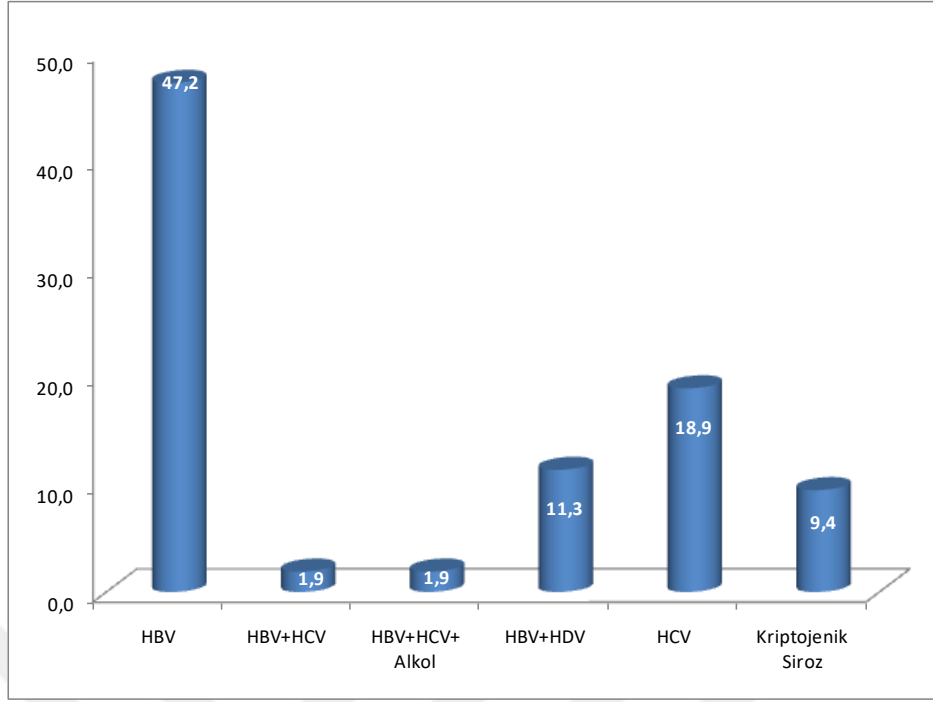
Tablo 4.1. Yaş gruplarına göre rastlanma sıklıkları ve yüzdeleri

	Sıklık (#)	Yüzde (%)
40 yaş altı	3	5,4
40-49 yaş	10	17,9
50-59 yaş	19	33,9
60-69 yaş	12	21,4
70-79 yaş	8	14,3
80 yaş ve üzeri	4	7,1
Toplam	56	100,0

HCC etiyojisi bilinen 52 olguya ait sıklıklar ve yüzdeler Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Buna göre en sık etiyojistik neden tek başına HBV enfeksiyonu varlığı (%47,2) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1).

Tablo 4.2. HCC etiyojisi bilinen olgulara ait rastlanma sıklıkları ve yüzdeleri

Etiyojisi	Sıklık (#)	Yüzde (%)
Alkol kullanım öyküsü	5	9,4
HBV	25	47,2
HBV+HCV	1	1,9
HBV+HCV+ Alkol kullanım öyküsü	1	1,9
HBV+HDV	6	11,3
HCV	10	18,9
Kriptojenik Siroz	5	9,4
Toplam	53	100,0



Şekil 4.1. HCC etiolojisine göre olguların yüzdeleri

HCC tedavisine yönelik, karaciğer nakli yapılan 19 hastanın klinik özellikleri ayrıca değerlendirilerek Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3. Tedaviye yönelik karaciğer nakli yapılan 19 hastanın klinik özellikleri

Hasta No.	Cinsiyet	Kan grubu	Etiyoloji	Child	AFP	Tümör Tipi	Grade	TNM evresi
2	E	A	HBV	B	2,87	Multifokal	1	Evre 2
4	E	0	HBV	A	2,2	tek	1	Evre 1
5	E	A	HBV	C	8,2	Multifokal	1	Evre 4A
7	E	A	HBV+HDV	B	65	Multifokal	2	Evre 2
8	E	A	HBV+HDV	C	22	tek	1	Evre 1
9	E	0	HCV	A	82	Multifokal	1	Evre 4A
10	E	B	HCV	B	7,2	Multifokal	1	Evre 4A
11	E	A	HBV+HDV	A	24	Multifokal	2	Evre 3
16	E	A	HCV	A	4955	Multifokal	3	Evre 4A
17	E	B	HBV	A	5,7	Multifokal	2	Evre 4A
20	E	A	HCV	B	5,5	Multifokal	2	Evre 2
21	E	A	HBV	A	345	Multifokal	2	Evre 4A
22	E	A	HBV+HDV	B	11,5	tek	2	Evre 2
23	E	0	HBV	B	21,3	Multifokal	?	?
28	E	A	HBV	A	8,6	Multifokal	2	Evre 4A
30	E	B	HBV+HCV	B	34	tek	1	Evre 2
45	E	A	Alkol kullanımı öyküsü	B	20	Multifokal	3	Evre 3
54	E	AB	HBV	B	15	tek	1	Evre 2
56	K	AB	HBV	B	73	tek	2	Evre 2

Enzim kesim noktası içeren her bir prob için belirlenen hasta ve kontrol grubu örneklerinden elde edilen metilasyon oranlarının ortalaması Tablo 4.4'te gösterilmektedir. Metilasyon oranları açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

Tablo 4.4. Hasta ve kontrol grubunda elde edilen metilasyon oranları

Gen adı (Ürün uzunluğu)	Metilasyon oranı (hasta grubu)	Standart sapma	Metilasyon oranı (kontrol grubu)	Standart sapma	p
<i>PMS2</i> (142 bç)	0,018	0,019	0,005	0,013	0,47
<i>PMS2</i> (154 bç)	0,016	0,038	0,001	0,005	0,30
<i>MSH6</i> (160 bç)	0,055	0,077	0,041	0,063	0,44
<i>MLH1</i> (166 bç)	0,004	0,012	0,002	0,006	0,25
<i>MSH2</i> (182 bç)	0,002	0,011	0,001	0,003	0,47
<i>MGMT</i> (193 bç)	0,001	0,004	0,045	0,085	0,19
<i>MLH1</i> (198 bç)	0,003	0,023	0,029	0,109	0,27
<i>MSH6</i> (209 bç)	0,028	0,048	0,000	0,000	0,14
<i>MSH3</i> (220 bç)	0,003	0,006	0,459	0,153	0,41
<i>MLH1</i> (237 bç)	0,063	0,072	0,083	0,113	0,42
<i>MLH1</i> (262 bç)	0,001	0,005	0,000	0,000	0,42
<i>MSH2</i> (274 bç)	0,046	0,088	0,000	0,000	0,34
<i>MSH3</i> (283 bç)	0,034	0,051	0,577	0,250	0,37
<i>MLH1</i> (292 bç)	0,020	0,034	0,008	0,018	0,43
<i>MSH6</i> (301 bç)	0,022	0,033	0,026	0,053	0,16
<i>MGMT</i> (319 bç)	0,000	0,000	0,021	0,068	0,44
<i>PMS2</i> (328 bç)	0,012	0,062	0,073	0,145	0,24
<i>MSH3</i> (346 bç)	0,031	0,072	0,005	0,014	0,39
<i>MLH3</i> (355 bç)	0,183	0,197	0,005	0,013	0,29
<i>MGMT</i> (373 bç)	0,007	0,018	0,286	0,362	0,26
<i>MSH2</i> (400 bç)	0,023	0,039	0,008	0,022	0,49

En az bir bölgeye ait metilasyon saptanan hastalar ve metilasyon durumları Tablo 4.5'te gösterilmiştir. Buna göre 56 olgunun 27'sinde (%48,2) çalışılan genlerden en az birine ait metilasyon, 13 (%23,2) tanesinde sadece tek bir gene ait metilasyon ve 14 (%25) olguda da birden fazla gene ait metilasyon saptanırken, sadece 1 hastada (% 1,8) tüm genlere ait metilasyon saptanmıştır.

Tablo 4.5. Hastalarda tüm genlerde metilasyon durumları

Hasta No.	<i>MLH1</i>	<i>PMS2</i>	<i>MSH6</i>	<i>MSH2</i>	<i>MGMT</i>	<i>MSH3</i>	<i>MLH3</i>
4	U	M	U	U	U	U	U
5	M	M	M	M	M	M	M
6	M	U	U	U	U	M	U
7	U	U	U	U	U	M	U
8	U	M	U	U	U	U	U
11	U	U	U	U	U	M	U
12	U	U	M	U	U	M	M
13	U	U	U	U	M	U	U
14	U	U	U	U	M	U	U
15	M	U	M	U	M	U	M
16	U	U	U	U	U	M	U
30	M	U	M	U	U	U	U
31	U	U	M	U	M	U	U
33	U	M	U	U	U	U	U
37	U	U	U	U	U	M	U
39	U	U	U	U	U	M	U
43	U	U	M	U	M	U	U
44	U	M	U	U	M	U	U
45	U	U	U	U	U	M	U
46	M	U	U	U	M	U	M
47	U	U	U	U	U	M	U
49	M	M	M	U	M	U	U
52	M	U	U	U	U	M	M
53	M	M	M	U	M	U	M
54	U	U	U	U	U	M	U
55	M	M	M	U	M	M	M
56	M	U	M	U	M	M	M

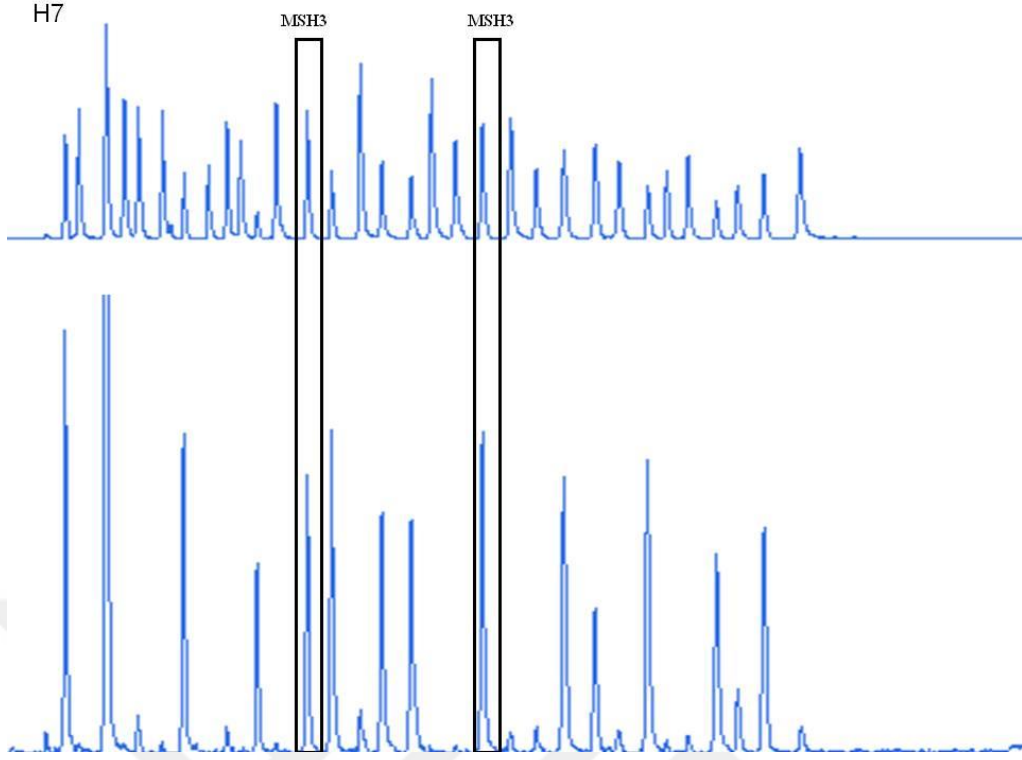
M: Metillenmiş U: Metillenmemiş

Tablo 4.6. Çalışılan her bir gene ait metillenmiş ve metillenmemiş örnek sayıları ve yüzdeleri

Gen Adı	Metilasyon Durumu	
	Metillenmiş (%)	Metillenmemiş (%)
<i>MLH1</i>	10 (17,9)	46 (82,1)
<i>PMS2</i>	8 (14,3)	48 (85,7)
<i>MSH6</i>	10 (17,9)	46 (82,1)
<i>MSH2</i>	1 (1,8)	55 (98,2)
<i>MGMT</i>	12 (21,4)	44 (78,6)
<i>MSH3</i>	14 (25,0)	42 (75,0)
<i>MLH3</i>	8 (14,3)	48 (85,7)

Çalışılan 7 gen içerisinde en fazla metilasyon saptanan gen, 14 (% 25,0) olgu ile *MSH3* olarak bulunmuştur. *MLH1* için 10 (% 17,9), *PMS2* için 8(% 14,3), *MSH6* için 10 (% 17,9), *MSH2* için 1 (% 1,8), *MGMT* için 12 (% 21,4) ve *MLH3* için 8 (%14,3) olguda metilasyon saptanmıştır. Metilasyon saptanmayan gen bölgesi bulunamamış ve *MSH2* geni için sadece 1 (% 1,8) olguda metilasyon saptanmıştır (Tablo 4.6).

Sadece tek bir gende metilasyon saptanan olgulara baktığımızda; tek başına en fazla metillenmiş olan gen 8 olgu ile *MSH3* geni iken, *PMS2* 3 ve *MGMT* ise 2 olguda saptanmıştır. *MLH1*, *MSH6*, *MLH3* ve *MSH2* genleri için metilasyon saptanan olguların tümünde diğer genlerinde en az birinde metilasyon bulunmuştur. *MSH3* genine ait metilasyon saptanan yedi numaralı olguya ait MLPA görüntüsü Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Yedi numaralı olguya ait MLPA görüntüsü. (MSH3 genine ait metilasyon saptanan problara ait pikler işaretlenmiştir.)

En az bir gende metilasyon saptanan hastalar tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılarak sonuçlar tabloda gösterilmiştir. Tümör sayısı bilinen 31 hastanın 7'sinde tek tümör saptanırken, 24'ünde multifokal tümör saptanmıştır. Metilasyon durumları ve tümör sayısı karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p=0,025$). Tek tümör olan örneklerde metilasyonun daha sık gözlendiği (% 85,7), tümör multifokal olduğunda ise metilasyon oranının azaldığı (% 37,0) görülmüştür. AFP yüksekliği, Grade ve TNM evresi bilinen hastaların metilasyon durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. İnfeksiyon parametreleri açısından değerlendirildiğinde HBV ve HCV pozitifliği olan bireylerde metilasyon varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Tümör sayısı, Grade, TNM evresi, AFP yüksekliği ve HBV ya da HCV pozitifliğine karşı metilasyon varlığının karşılaştırılması

		Metilasyon				P
		Var		Yok		
		#	%	#	%	
Tümör sayısı (n: 31)						
	Tek	6	85,7	1	14,3	0,025*
	Multifokal	9	37,5	15	62,5	
Grade (n: 28)						
	1	6	54,5	5	45,5	0,785
	2	5	41,7	7	58,3	
	3	2	40,0	3	60,0	
TNM Evresi (n: 18)						
	1	2	100,0	-	-	0,153
	2	4	57,1	3	42,9	
	3	2	100,0	-	-	
	4	2	28,6	5	71,4	
HBV (n: 53)						
	Pozitif	15	45,5	18	54,5	0,97
	Negatif	9	45,0	11	55,0	
HCV (n:53)						
	Pozitif	5	41,7	19	58,3	0,78
	Negatif	19	46,3	7	53,7	
AFP (n: 50)						
	Yüksek	17	42,5	23	57,5	0,12
	Düşük	7	70,0	3	30,0	

*p< 0,05, AFP: Alfa-fetoprotein

Tanı anında AFP düzeyleri bilinen 50 hastada çalışılan her bir gene ait metilasyon durumları karşılaştırılmış ve buna göre *MSH6* geni için AFP düzeyi ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (Tablo 4.9). AFP düzeyleri yüksek olan bireylere ait örneklerde *MSH6* geni için metillenmiş olma oranı daha yüksek bulunmuştur (p=0,038). Aynı zamanda normal AFP değerlerinin altında ve üzerinde olan örneklerin metilasyon durumları karşılaştırılmış, ancak gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. AFP değerlerinin normal veya yüksek olmasına Gore her bir gene ait metilasyon durumlarının karşılaştırılması

		AFP					
		Yüksek		Düşük		P	Yüksek - Düşük OR (95% CI)
		#	%	#	%		
<i>MLH1</i>	Toplam	40		10			
	Metillenmiş	7	17,5	2	20,0	0,85	0,848 (0,15 - 4,89)
	Metillenmemiş	33	82,5	8	80,0		
<i>PMS2</i>	Toplam	40		10			
	Metillenmiş	4	10,0	2	20,0	0,38	0,444 (0,07 - 2,86)
	Metillenmemiş	36	90,0	8	80,0		
<i>MSH6</i>	Toplam	40		10			
	Metillenmiş	6	15,0	2	20,0	0,70	0,71 (0,12 - 4,17)
	Metillenmemiş	34	85,0	8	80,0		
<i>MSH2</i>	Toplam	40		10			
	Metillenmiş	-	-	-	-		
	Metillenmemiş	40	100,0	10	100,0		
<i>MGMT</i>	Toplam	40		10			
	Metillenmiş	7	17,5	2	20,0	0,85	0,85 (0,15 - 4,89)
	Metillenmemiş	33	82,5	8	80,0		
<i>MSH3</i>	Toplam	40		10			
	Metillenmiş	9	22,5	4	40,0	0,26	0,435 (0,10 - 1,89)
	Metillenmemiş	31	77,5	6	60,0		
<i>MLH3</i>	Toplam	40		10			
	Metillenmiş	6	15,0	1	10,0	0,68	1,588 (0,17 - 14,93)
	Metillenmemiş	34	85,0	9	90,0		

Tablo 4.9. AFP değerleri ortalamasına gre her bir gene ait metilasyon durumlarının karşılaştırılması

		#	AFP değeri ortalaması	Standart Sapma	<i>p</i>
<i>MLH1</i>	Metillenmiş	10	22,20	22,23	0,575
	Metillenmemiş	40	2025,10	11129,60	
<i>PMS2</i>	Metillenmiş	8	10,78	9,31	0,622
	Metillenmemiş	42	1931,90	10862,95	
<i>MSH6</i>	Metillenmiş	10	7421,18	22158,14	0,038*
	Metillenmemiş	40	175,35	785,89	
<i>MSH2</i>	Metillenmiş	1	8,20	-	0,872
	Metillenmemiş	49	1657,50	10062,60	
<i>MGMT</i>	Metillenmiş	11	6585,71	21188,29	0,061
	Metillenmemiş	39	225,20	833,55	
<i>MSH3</i>	Metillenmiş	12	578,56	1465,01	0,681
	Metillenmemiş	38	1954,82	11416,05	
<i>MLH3</i>	Metillenmiş	8	237,96	611,45	0,672
	Metillenmemiş	42	1888,62	10867,30	

* $p < 0,05$

MLH1 geni promotor metilasyonu açısından incelenen örneklere ait sonuçlar cinsiyet, kan grubu, etiyoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılmıştır (Tablo 4.10). Bu parametreler açısından metillenmiş olan ve olmayan örneklere istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Etiyolojik faktörler açısından alkol kullanım öyküsü kullanım öyküsü olan 6 örnekte *MLH1* geni için metilasyon saptanamamıştır.

Tablo 4.10. *MLH1* geni metilasyonu ile cinsiyet, kan grubu, etiyoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılması

		<i>MLH1</i>				<i>P</i>
		Metillenmiş		Metillenmemiş		
		#	%	#	%	
Cinsiyet (n: 56)	Kadın	1	50,0	1	50,0	0,227
	Erkek	9	16,7	45	83,3	
KAN GRUBU (n:54)	0	1	7,7	12	92,3	0,447
	A	5	18,5	22	81,5	
	B	3	25,0	9	75,0	
	AB	1	50,0	1	50,0	
ETİYOLOJİ (n:53)	Alkol kullanım öyküsü	-	-	5	100,0	0,354
	HBV	5	20,0	20	80,0	
	HBV+HCV	1	100,0	-	-	
	HBV+HCV +alkol kullanım öyküsü	-	-	1	100,0	
	HBV+HDV	1	16,7	5	83,3	
	HCV	1	10,0	9	90,0	
	kriptojenik siroz	1	20,0	4	80,0	
Child sınıfı (n:19)	A	-	-	7	100,0	0,201
	B	2	20,0	8	80,0	
	C	1	50,0	1	50,0	
TÜMÖR SAYISI (n:31)	Tek	3	42,9	4	57,1	0,074
	Multifokal	3	12,5	21	87,5	
GRADE (n:28)	1	2	18,2	9	81,8	0,471
	2	3	25,0	9	75,0	
	3	-	-	5	100,0	
TNM Evresi (n:18)	Evre 1	-	-	2	100,0	0,672
	Evre 2	2	28,6	5	71,4	
	Evre 3	-	-	2	100,0	
	Evre 4A	1	14,3	6	85,7	

MLH1 geninin diğer genlerle korelasyonuna bakıldığında tüm genlerle anlamlı ilişki saptanırken, en kuvvetli ilişki *MLH3* geni ile bulunmuştur (p: 0,00 OR: 105,0 CI: 9,533 - 1156,491) (Tablo 4.11)

Tablo 4.11. *MLH1* geni metilasyonunun diğer genlere ait metilasyon durumları ile ilişkisi

		MLH1					
		Metillenmiş		Metillenmemiş		Metillenmiş-Metillenmemiş	
		#	%	#	%	p	OR (95% CI)
<i>PMS2</i>	Toplam	10		46			
	Metillenmiş	4	40,0	4	8,7	0,01	7,0 (1,373 - 35,678)
	Metillenmemiş	6	60,0	42	91,3		
<i>MSH6</i>	Toplam	10		46			
	Metillenmiş	7	70,0	3	6,5	0,00	33,444 (5,592 - 34,475)
	Metillenmemiş	3	30,0	43	93,5		
<i>MSH2</i>	Toplam	10		46			
	Metillenmiş	1	10,0	-	-	0,03	
	Metillenmemiş	9	90,0	46	100,0		
<i>MGMT</i>	Toplam	10		46			
	Metillenmiş	7	70,0	5	10,9	0,00	19,133 (3,710 - 98,685)
	Metillenmemiş	3	30,0	41	89,1		
<i>MSH3</i>	Toplam	10		46			
	Metillenmiş	5	50,0	9	19,6	0,04	4,111 (0,976 - 17,313)
	Metillenmemiş	5	50,0	37	80,4		
<i>MLH3</i>	Toplam	10		46			
	Metillenmiş	7	70,0	1	2,2	0,00	105,0 (9,533 - 1156,491)
	Metillenmemiş	3	30,0	45	97,8		

PMS2 geni promotor metilasyonu açısından incelenen örneklere ait sonuçlar cinsiyet, kan grubu, etiyoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılmıştır. Cinsiyet, kan grubu ve etiyoloji açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Değerlendirilen 2 kadın olguda *PMS2* geni için metilasyon saptanmamıştır. Child sınıfı bilinen 19 hastanın metilasyon durumlarına bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmüştür (p=0,002). En fazla metillenmiş olan olguların CHILD C evresinde olduğu görülmüştür. Tümör sayısına göre metillenmiş olan ve olmayan örneklere baktığımızda tek tümör olan olgularda daha fazla metilasyon olduğu görülmüştür (p=0,029). Tümör Grade'i bilinen 28

örnekten metilasyon saptanan 4 olgunun Grade 1 olduğu görülmüştür (p=0,029). TNM evrelemesine göre bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu (p=0,008) ve en fazla metilasyonun Evre 1 örneklerde olduğu görülmüştür (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. PMS2 geni metilasyonu ile cinsiyet, kan grubu, etiyoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılması

		PMS2				p
		Metillenmiş		Metillenmemiş		
		#	%	#	%	
Cinsiyet (n: 56)	Kadın	-	-	2	100,0	0,557
	Erkek	8	14,8	46	85,2	
KAN GRUBU (n:54)	0	2	15,4	11	84,6	0,791
	A	5	18,5	22	81,5	
	B	1	8,3	11	91,7	
	AB	-	-	2	100,0	
ETİYOLOJİ (n:53)	Alkol kullanım öyküsü	-	-	5	100,0	0,372
	HBV	5	20,0	20	80,0	
	HBV+HCV	-	-	1	100,0	
	HBV+HCV+ alkol kullanım öyküsü	-	-	1	100,0	
	HBV+HDV	2	33,3	4	66,7	
	HCV	-	-	10	100,0	
	Kriptojenik siroz	-	-	5	100,0	
Child sınıfı (n:19)	A	1	14,3	6	85,7	0,002*
	B	-	-	10	100,0	
	C	2	100,0	-	-	
TÜMÖR SAYISI (n:31)	Tek	3	42,9	4	57,1	0,029*
	Multifokal	2	8,3	22	91,7	
GRADE (n:28)	1	4	36,4	7	63,6	0,027*
	2	-	-	12	100,0	
	3	-	-	5	100,0	
TNM Evresi (n:18)	Evre 1	2	100,0	-	-	0,008*
	Evre 2	-	-	7	100,0	
	Evre 3	-	-	2	100,0	
	Evre 4A	1	14,3	6	85,7	

*p< 0,05

Tüm genler ile *PMS2* geninin rastlanma sıklığının birlikteliğine bakıldığında en yüksek ilişki *MGMT* geni ile bulunurken (p: 0,00 OR: 9,762 CI:1,893 - 50,350) *MSH3* geni ile ilişki saptanmamıştır (4.13).

Tablo 4.13. *PMS2* geni metilasyonunun diğer genlere ait metilasyon durumları ile ilişkisi

		PMS2					
		Metillenmiş		Metillenmemiş		Metillenmiş-Metillenmemiş	
		#	%	#	%	P	OR (95% CI)
<i>MLH1</i>	Toplam	8		48			
	Metillenmiş	4	50,0	6	12,5	0,01	7,0 (1,373 - 35,678)
	Metillenmemiş	4	50,0	42	87,5		
<i>MSH6</i>	Toplam	8		48			
	Metillenmiş	4	50,0	6	12,5	0,01	7,0 (1,373 - 35,678)
	Metillenmemiş	4	50,0	42	87,5		
<i>MSH2</i>	Toplam	8		48			
	Metillenmiş	1	12,5	-	-	0,01	
	Metillenmemiş	7	87,5	48	100,0		
<i>MGMT</i>	Toplam	8		48			
	Metillenmiş	5	62,5	7	14,6	0,00	9,762 (1,893 - 50,350)
	Metillenmemiş	3	37,5	41	85,4		
<i>MSH3</i>	Toplam	8		48			
	Metillenmiş	2	25,0	12	25,0	1,00	1,0 (0,178 - 5,632)
	Metillenmemiş	6	75,0	36	75,0		
<i>MLH3</i>	Toplam	8		48			
	Metillenmiş	3	37,5	5	10,4	0,04	5,16 (0,938 - 28,382)
	Metillenmemiş	5	62,5	43	89,6		

MSH6 geni promotor metilasyonu açısından incelenen örneklere ait sonuçlar cinsiyet, kan grubu, etiyojoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılmıştır. Tümör sayısı dışında metilasyon durumları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Buna göre tek tümörlerde *MSH6* geninin daha çok metillenmiş olduğu görülmüştür ($p=0,029$) (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. *MSH6* geni metilasyonu ile cinsiyet, kan grubu, etiyojoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılması

		<i>MSH6</i>				<i>p</i>
		Metillenmiş		Metillenmemiş		
		#	%	#	%	
Cinsiyet (n: 56)	Kadın	1	50,0	1	50,0	0,227
	Erkek	9	16,7	45	83,3	
KAN GRUBU (n:54)	0	1	7,7	12	92,3	0,388
	A	4	14,8	23	85,2	
	B	3	25,0	9	75,0	
	AB	1	50,0	1	50,0	
ETİYOLOJİ (n:53)	Alkol kullanım öyküsü	1	20,0	4	80,0	0,532
	HBV	5	20,0	20	80,0	
	HBV+HCV	1	100,0	-	-	
	HBV+HCV alkol kullanım öyküsü	-	-	1	100,0	
	HBV+HDV	1	16,7	5	83,3	
	HCV	1	10,0	9	90,0	
	kriptojenik siroz	1	20,0	4	80,0	
Child sınıfı (n:19)	A	-	-	7	100,0	0,201
	B	2	20,0	8	80,0	
	C	1	50,0	1	50,0	
TÜMÖR SAYISI (n:31)	Tek	3	42,9	4	57,1	0,029*
	Multifokal	2	8,3	22	91,7	
GRADE (n:28)	1	2	18,2	9	81,8	0,519
	2	1	8,3	11	91,7	
	3	-	-	5	100,0	
TNM Evresi (n:18)	Evre 1	-	-	2	100,0	0,672
	Evre 2	2	28,6	5	71,4	
	Evre 3	-	-	2	100,0	
	Evre 4A	1	14,3	6	85,7	

* $p < 0,05$

MSH6 geni metilasyonu ile diğer genlerin metilasyonu arasındaki ilişkiye baktığımızda *MSH3* geni dışındaki beş gen için anlamlı korelasyon saptanmıştır. En kuvvetli ilişki *MGMT* geni için bulunmuştur (p:0,00 OR: 42,0 CI:6,55 - 269,30)(Tablo 4.15).

Tablo 4.15. *MSH6* geni metilasyonunun diğer genlere ait metilasyon durumları ile ilişkisi

		<i>MSH6</i>					
		Metillenmiş		Metillenmemiş		Metillenmiş-Metillenmemiş	
		#	%	#	%	P	OR (95% CI)
<i>MLH1</i>	Toplam	10		46			
	Metillenmiş	7	70,0	3	6,5	0,00	33,44 (5,592 - 200,034)
	Metillenmemiş	3	30,0	43	93,5		
<i>PMS2</i>	Toplam	10		46			
	Metillenmiş	4	40,0	4	8,7	0,01	7,0 (1,373 - 35,678)
	Metillenmemiş	6	60,0	42	91,3		
<i>MSH2</i>	Toplam	10		46			
	Metillenmiş	1	10,0	-	-	0,03	
	Metillenmemiş	9	90,0	46	100,0		
<i>MGMT</i>	Toplam	10		46			
	Metillenmiş	8	80,0	4	8,7	0,00	42,0 (6,55 - 269,30)
	Metillenmemiş	2	20,0	42	91,3		
<i>MSH3</i>	Toplam	10		46			
	Metillenmiş	4	40,0	10	21,7	0,23	2,40 (0,565 - 10,193)
	Metillenmemiş	6	60,0	36	78,3		
<i>MLH3</i>	Toplam	10		46			
	Metillenmiş	6	60,0	2	4,3	0,00	33,00 (4,938 - 220,556)
	Metillenmemiş	4	40,0	44	95,7		

MSH2 geni promotor metilasyonu açısından incelenen örneklere ait sonuçlar cinsiyet, kan grubu, etiyojoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılmıştır. Child sınıfı ve metilasyon durumları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p=0,011) (Tablo 4.16). *MSH2* geni için tek bir örnekte metilasyon saptanması nedeniyle diğer genler ile ilişkisini belirlemek için korelasyon analizi yapılamamıştır.

Tablo 4.16. *MSH2* geni metilasyonu ile cinsiyet, kan grubu, etiyojoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılması

		<i>MSH2</i>				<i>p</i>
		Metillenmiş		Metillenmemiş		
		#	%	#	%	
Cinsiyet (n: 56)	Kadın	-	-	2	100,0	0,846
	Erkek	1	1,9	53	98,1	
KAN GRUBU (n:54)	0	-	-	13	100,0	0,797
	A	1	3,7	26	96,3	
	B	-	-	12	100,0	
ETİYOLOJİ (n:53)	AB	-	-	2	100,0	0,98
	Alkol kullanım öyküsü	-	-	5	100,0	
	HBV	1	4,0	24	96,0	
	HBV+HCV	-	-	1	100,0	
	HBV+HCV alkol kullanım öyküsü	-	-	1	100,0	
	HBV+HDV	-	-	6	100,0	
	HCV	-	-	10	100,0	
kriptojenik siroz	-	-	5	100,0		
Child sınıfı (n:19)	A	-	-	7	100,0	0,011*
	B	-	-	10	100,0	
	C	1	50,0	1	50,0	
TÜMÖR SAYISI (n:31)	Tek	-	-	7	100,0	0,583
	Multifokal	1	4,2	23	95,8	
GRADE (n:28)	1	1	9,1	10	90,9	0,449
	2	-	-	12	100,0	
	3	-	-	5	100,0	
TNM Evresi (n:18)	Evre 1	-	-	2	100,0	0,645
	Evre 2	-	-	7	100,0	
	Evre 3	-	-	2	100,0	
	Evre 4A	1	14,3	6	85,7	

*p< 0,05

MGMT geni promotor metilasyonu açısından incelenen örneklere ait sonuçlar cinsiyet, kan grubu, etiyojoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılmış olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. *MGMT* geni metilasyonu ile cinsiyet, kan grubu, etiyojoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılması

		<i>MGMT</i>				<i>P</i>
		Metillenmiş		Metillenmemiş		
		#	%	#	%	
Cinsiyet (n: 56)	Kadın	1	50,0	1	50,0	0,316
	Erkek	11	20,4	43	79,6	
KAN GRUBU (n:54)	0	3	23,1	10	76,9	0,729
	A	5	18,5	22	81,5	
	B	2	16,7	10	83,3	
	AB	1	50,0	1	50,0	
ETİYOLOJİ (n:53)	Alkol kullanım öyküsü	1	20,0	4	80,0	0,758
	HBV	6	24,0	19	76,0	
	HBV+HCV	-	-	1	100,0	
	HBV+HCV alkol kullanım öyküsü	-	-	1	100,0	
	HBV+HDV	1	16,7	5	83,3	
	HCV	-	-	10	100,0	
	kriptojenik siroz	1	20,0	4	80,0	
Child sınıfı (n:19)	A	-	-	7	100,0	0,126
	B	1	10,0	9	90,0	
	C	1	50,0	1	50,0	
TÜMÖR SAYISI (n:31)	Tek	2	28,6	5	71,4	0,16
	Multifokal	2	8,3	22	91,7	
GRADE (n:28)	1	1	9,1	10	90,9	0,789
	2	1	8,3	11	91,7	
	3	-	-	5	100,0	
TNM Evresi (n:18)	Evre 1	-	-	2	100,0	0,887
	evre 2	1	14,3	6	85,7	
	evre 3	-	-	2	100,0	
	Evre 4A	1	14,3	6	85,7	

*p< 0,05

MGMT geni metilasyonu ile diğer genlerin metilasyonu korelasyonuna bakıldığında *MSH2* ve *MSH3* genleri dışındaki genler için ilişki saptanmıştır. En kuvvetli ilişki *MSH6* geni için saptanmıştır (p:0,00 OR: 42,00 CI:6,55 - 269,30) (Tablo 4.18).

Tablo 4.18. *MGMT* geni metilasyonunun diğer genlere ait metilasyon durumları ile ilişkisi

		MGMT					
		Metillenmiş		Metillenmemiş		Metillenmiş-Metillenmemiş	
		#	%	#	%	P	OR (95% CI)
<i>MLH1</i>	Toplam	12		44			
	Metillenmiş	7	58,3	3	6,8	0,00	19,133 (3,710 - 98,685)
	Metillenmemiş	5	41,7	41	93,2		
<i>PMS2</i>	Toplam	12		44			
	Metillenmiş	5	41,7	3	6,8	0,00	9,762 (1,893 - 50,35)
	Metillenmemiş	7	58,3	41	93,2		
<i>MSH6</i>	Toplam	12		44			
	Metillenmiş	8	66,7	2	4,5	0,00	42,00 (6,55 - 269,30)
	Metillenmemiş	4	33,3	42	95,5		
<i>MSH2</i>	Toplam	12		44			
	Metillenmiş	1	8,3	-	-	0,05	
	Metillenmemiş	11	91,7	44	100,0		
<i>MSH3</i>	Toplam	12		44			
	Metillenmiş	3	25,0	11	25,0	1,00	1,00 (0,229 - 4,367)
	Metillenmemiş	9	75,0	33	75,0		
<i>MLH3</i>	Toplam	12		44			
	Metillenmiş	6	50,0	2	4,5	0,00	21,00 (3,421 - 128,908)
	Metillenmemiş	6	50,0	42	95,5		

MSH3 geni promotor metilasyonu açısından incelenen örneklere ait sonuçlar cinsiyet, kan grubu, etiyojoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılmıştır. Kan grubu açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunurken ($p=0,008$), diğer parametreler için anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 4.19).

Tablo 4.19. *MSH3* geni metilasyonu ile cinsiyet, kan grubu, etiyojoloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılması

		<i>MSH3</i>				<i>P</i>
		Metillenmiş		Metillenmemiş		
		#	%	#	%	
Cinsiyet (n: 56)	Kadın	1	50,0	1	50,0	0,406
	Erkek	13	24,1	41	75,9	
KAN GRUBU (n:54)	0	2	15,4	11	84,6	0,008*
	A	9	33,3	18	66,7	
	B	-	-	12	100,0	
	AB	2	100,0	-	-	
ETİYOLOJİ (n:53)	Alkol kullanım öyküsü	1	20,0	4	80,0	0,499
	HBV	4	16,0	21	84,0	
	HBV+HCV	-	-	1	100,0	
	HBV+HCV alkol kullanım öyküsü	-	-	1	100,0	
	HBV+HDV	3	50,0	3	50,0	
	HCV	4	40,0	6	60,0	
	kriptojenik siroz	2	40,0	3	60,0	
	Child sınıfı (n:19)	A	2	28,6	5	
B	4	40,0	6	60,0		
C	1	50,0	1	50,0		
TÜMÖR SAYISI (n:31)	Tek	2	28,6	5	71,4	0,976
	Multifokal	7	29,2	17	70,8	
GRADE (n:28)	1	2	18,2	9	81,8	0,444
	2	5	41,7	7	58,3	
	3	2	40,0	3	60,0	
TNM Evresi (n:18)	Evre 1	-	-	2	100,0	0,189
	evre 2	3	42,9	4	57,1	
	evre 3	2	100,0	-	-	
	Evre 4A	2	28,6	5	71,4	

* $p < 0,05$

MSH3 geni için *MLH1* (p: 0,04 OR: 4,11 CI: 0,976 - 17,313) ve *MLH3* (p: 0,01 OR: 7,22 CI: 1,452 - 35,93) dışındaki genler için korelasyon saptanmamıştır (Tablo 4.20).

Tablo 4.20. *MGMT* geni metilasyonunun diğer genlere ait metilasyon durumları ile ilişkisi

		MSH3					
		Metillenmiş		Metillenmemiş		Metillenmiş-Metillenmemiş	
		#	%	#	%	P	OR (95% CI)
<i>MLH1</i>	Toplam	14		42			
	Metillenmiş	5	35,7	5	11,9	0,04	4,11 (0,976 - 17,313)
	Metillenmemiş	9	64,3	37	88,1		
<i>PMS2</i>	Toplam	14		42			
	Metillenmiş	2	14,3	6	14,3	1,00	2,40 (0,565 - 10,193)
	Metillenmemiş	12	85,7	36	85,7		
<i>MSH6</i>	Toplam	14		42			
	Metillenmiş	4	28,6	6	14,3	0,23	2,40 (0,565 - 10,193)
	Metillenmemiş	10	71,4	36	85,7		
<i>MSH2</i>	Toplam	14		42			
	Metillenmiş	1	7,1	-	-	0,08	
	Metillenmemiş	13	92,9	42	100,0		
<i>MGMT</i>	Toplam	14		42			
	Metillenmiş	3	21,4	9	21,4	1,00	1,00 (0,229 - 4,367)
	Metillenmemiş	11	78,6	33	78,6		
<i>MLH3</i>	Toplam	14		42			
	Metillenmiş	5	35,7	3	7,1	0,01	7,22 (1,452 - 35,93)
	Metillenmemiş	9	64,3	39	92,9		

MLH3 geni promotor metilasyonu açısından incelenen örneklere ait sonuçlar cinsiyet, kan grubu, etiyooloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılmış, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 4.21).

Tablo 4.21. *MSH3* geni metilasyonu ile cinsiyet, kan grubu, etiyooloji, Child sınıfı, Tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından karşılaştırılması

		<i>MLH3</i>				P
		Metillenmiş		Metillenmemiş		
		#	%	#	%	
Cinsiyet (n: 56)	Kadın	1	50,0	1	50,0	0,142
	Erkek	7	13,0	47	87,0	
KAN GRUBU (n:54)	0	2	15,4	11	84,6	0,5
	A	4	14,8	23	85,2	
	B	1	8,3	11	91,7	
	AB	1	50,0	1	50,0	
ETİYOLOJİ (n:53)	Alkol kullanım öyküsü	-	-	5	100,0	0,953
	HBV	4	16,0	21	84,0	
	HBV+HCV	-	-	1	100,0	
	HBV+HCV alkol kullanım öyküsü	-	-	1	100,0	
	HBV+HDV	1	16,7	5	83,3	
	HCV	1	10,0	9	90,0	
	kriptojenik siroz	1	20,0	4	80,0	
	A	-	-	7	100,0	
Child sınıfı (n:19)	B	1	10,0	9	90,0	0,126
	C	1	50,0	1	50,0	
	TÜMÖR SAYISI (n:31)	Tek	1	14,3	6	
Multifokal	2	8,3	22	91,7		
GRADE (n:28)	1	1	9,1	10	90,9	0,584
	2	2	16,7	10	83,3	
	3	-	-	5	100,0	
	Evre 1	-	-	2	100,0	
TNM Evresi (n:18)	evre 2	1	14,3	6	85,7	0,887
	evre 3	-	-	2	100,0	
	Evre 4A	1	14,3	6	85,7	

*p< 0,05

MLH3 geni metilasyonu ile diğer genlerin ilişkisine baktığımızda tüm genler için korelasyon saptanırken en yüksek ilişki *MLH1* geni için bulunmuştur (p:0,00 OR: 105,00 CI: 9,533 - 1156,491)(Tablo 4.22).

Tablo 4.22. *MLH3* geni metilasyonunun diğer genlere ait metilasyon durumları ile ilişkisi

		MLH3					
		Metillenmiş		Metillenmemiş		p	Metillenmiş-Metillenmemiş OR (95% CI)
		#	%	#	%		
<i>MLH1</i>	Toplam	8		48			
	Metillenmiş	7	87,5	3	6,3	0,00	105,00 (9,533 - 1156,491)
	Metillenmemiş	1	12,5	45	93,8		
<i>PMS2</i>	Toplam	8		48			
	Metillenmiş	3	37,5	5	10,4	0,04	5,16 (0,938 - 28,382)
	Metillenmemiş	5	62,5	43	89,6		
<i>MSH6</i>	Toplam	8		48			
	Metillenmiş	6	75,0	4	8,3	0,00	33,00 (4,938 - 220,556)
	Metillenmemiş	2	25,0	44	91,7		
<i>MSH2</i>	Toplam	8		48			
	Metillenmiş	1	12,5	-	-	0,01	
	Metillenmemiş	7	87,5	48	100,0		
<i>MGMT</i>	Toplam	8		48			
	Metillenmiş	6	75,0	6	12,5	0,00	21,00 (3,421 - 128,908)
	Metillenmemiş	2	25,0	42	87,5		
<i>MSH3</i>	Toplam	8		48			
	Metillenmiş	5	62,5	9	18,8	0,01	7,22 (1,452 - 35,93)
	Metillenmemiş	3	37,5	39	81,3		

Hepatit enfeksiyonu ve metilasyon ilişkisini değerlendirmek amacıyla diğer etiyolojik faktörler göz önünde bulundurulmaksızın, HBV ve HCV pozitifliği ile her bir gene ait metilasyon durumu arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. HBV pozitifliği olan örneklerde *PMS2* geni metilasyonu için anlamlı ilişki saptanırken, diğer genler açısından anlamlı ilişki saptanmamıştır (Tablo 4.23).

Tablo 4.23. Değerlendirilen genlerin metilasyon durumları ve HBV pozitifliği ilişkisi

		HBV					
		Pozitif		Negatif		p	Pozitif/ Negatif OR (95% CI)
		#	%	#	%		
<i>MLH1</i>	Toplam	33		20			
	Metillenmiş	7	21,2	2	10,0	0,29	2,42 (0,45 - 13,03)
	Metillenmemiş	26	78,8	18	90,0		
<i>PMS2</i>	Toplam	33		20			
	Metillenmiş	7	21,2	-	-	0,027*	
	Metillenmemiş	26	78,8	20	100,0		
<i>MSH6</i>	Toplam	33		20			
	Metillenmiş	7	21,2	3	15,0	0,58	1,53 (0,35 - 6,73)
	Metillenmemiş	26	78,8	17	85,0		
<i>MSH2</i>	Toplam	33		20			
	Metillenmiş	1	3,0	-	-	0,43	
	Metillenmemiş	32	97,0	20	100,0		
<i>MGMT</i>	Toplam	33		20			
	Metillenmiş	7	21,2	2	10,0	0,29	2,42 (0,45 - 13,03)
	Metillenmemiş	26	78,8	18	90,0		
<i>MSH3</i>	Toplam	33		20			
	Metillenmiş	7	21,2	7	35,0	0,27	0,50 (0,15 - 1,73)
	Metillenmemiş	26	78,8	13	65,0		
<i>MLH3</i>	Toplam	33		20			
	Metillenmiş	5	15,2	2	10,0	0,59	1,061 (0,28 - 9,19)
	Metillenmemiş	28	84,8	18	90,0		

HCV pozitifliği ve genlerin metilasyon durumları arasında ilişki bulunamamıştır (Tablo 4.23).

Tablo 4.24. Değerlendirilen genlerin metilasyon durumu ve HCV pozitifliği ilişkisi

		HCV					
		Pozitif		Negatif		p	Pozitif- Negatif OR (95% CI)
		#	%	#	%		
<i>MLH1</i>	Total	12		41			
	Metillenmiş	2	16,7	7	17,1	0,97	0,97 (0,17 - 5,44)
	Metillenmemiş	10	83,3	34	82,9		
<i>PMS2</i>	Total	12		41			
	Metillenmiş	-	-	7	17,1	0,12	
	Metillenmemiş	12	100,0	34	82,9		
<i>MSH6</i>	Total	12		41			
	Metillenmiş	2	16,7	8	19,5	0,83	0,83 (0,15 - 4,53)
	Metillenmemiş	10	83,3	33	80,5		
<i>MSH2</i>	Total	12		41			
	Metillenmiş	-	-	1	2,4	0,59	
	Metillenmemiş	12	100,0	40	97,6		
<i>MGMT</i>	Total	12		41			
	Metillenmiş	-	-	9	22,0	0,08	
	Metillenmemiş	12	100,0	32	78,0		
<i>MSH3</i>	Total	12		41			
	Metillenmiş	4	33,3	10	24,4	0,54	1,55 (0,38 - 6,26)
	Metillenmemiş	8	66,7	31	75,6		
<i>MLH3</i>	Total	12		41			
	Metillenmiş	1	8,3	6	14,6	0,57	0,53 (0,06 - 4,90)
	Metillenmemiş	11	91,7	35	85,4		

5. TARTIŞMA

Kanser; insan vücudunda birlikte işlev gören hücrelerin normal bölünme ve çoğalma fonksiyonlarında aksaklıklara bağlı oluşan ve günümüzde önemli bir sağlık problemi haline gelmiş bir hastalıktır. Genetik bir hastalık olarak kanser; genellikle kalıtsal kanser sendromlarında karşımıza çıkan genetik değişiklikler sonucu oluşabileceği gibi, normal ilerleyen hücre işlevlerinde görevli genetik mekanizmaların bozulması ile de karşımıza çıkabilmektedir. Sadece ABD’ de 2010 yılında 171.000 kanser nedeni ölüm beklentisi gözönünde bulundurulduğunda kanserin birçok araştırmacı için merak uyandıran bir çalışma konusu olması şaşırtıcı olmamaktadır (89).

Epigenetik değişiklikler; nükleotid dizisinde değişiklik olmaksızın gözlenen fenotipik farklılıkların açıklanmasında en önemli mekanizmadır. Epigenetik mekanizmaların tanımlanmaya başlanmasından sonra, normal yaşam döngüsünün devam ettirilmesinde rol oynadıkları gibi, bu mekanizmaların bozulması ile başta kanser olmak üzere birçok genetik hastalığın ortaya çıktığı gösterilmiştir (90). Epigenetik değişiklikler içerisinde en fazla tanımlanan mekanizma olan promotor bölge hipermetilasyonu, kanser gelişiminin önlenmesinden sorumlu birçok genin inaktivasyonu ile ilişkili önemli bir epigenetik değişikliktir (76). “Kanser ve metilasyon” ilişkisini araştıran çalışmalar 1940’lardan itibaren yapılmaya başlanmış, günümüze gelindiğinde sık kullanılan veri tabanlarında bu konu başlığı ile ilgili yazılı makale sayısı 17,000’e ulaşmıştır (91).

Dünyada en sık görülen beşinci neoplazm olan HCC aynı zamanda kanser ilişkili ölümlerin en sık üçüncü nedenidir (2). Oldukça saldırgan seyirli ve kısa yaşam beklentisi olan bu tümörler sıklıkla kronik karaciğer hastalığı ve siroz zemininde gelişmektedir. Risk faktörlerinin oldukça iyi tanımlandığı HCC, dağılımının coğrafi farklılık göstermesiyle de dikkati çekmektedir (4). Diyetle alınan aflatoksinler dışarıda bırakıldığında coğrafi farklılık göstermeksizin temel etiyolojik neden kronik viral hepatitler olarak bildirilmiştir. Her ne kadar etiyolojik etkenler iyi tanımlanmış olsa da uygun tarama ve hedeflenmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesi için HCC moleküler patogenezinin iyi tanımlanması gerekmektedir. Aralarında DNA onarım mekanizmalarını ilgilendiren genlerin de bulunduğu bir moleküler sınıflama HCC için hazırlanmıştır (38). Ek olarak bir grup MMR

geninin HCC örneklerinde azalmış ifadenmesi gösterilmiş fakat bunu açıklayan bir mekanizma ortaya konmamıştır (39).

Çalışmamızda histopatolojik olarak HCC tanısı almış parafin blok örneklerinde DNA onarım sisteminde görevli *MLH1*, *PMS2*, *MSH6*, *MSH2*, *MGMT*, *MSH3* ve *MLH3* genlerine ait metilasyon profilleri MS-MLPA yöntemi ile değerlendirilerek bu örneklerde normal dokuya göre artmış promotör metilasyonu varlığı gösterilmiştir. Ek olarak, klinik bulgularına ulaşılabilen örneklerin metilasyon profilleri klinik veriler ile birlikte değerlendirilmiştir.

Çalışmamıza dahil edilen hasta grubunda, erkek cinsiyette (% 96,4) hastalığın görülme sıklığının kadınlara göre (%3,6) belirgin olarak fazla olduğu görülmektedir. Literatürde de rastlanma sıklığının erkek cinsiyette belirgin bir şekilde fazla olduğu bildirilen HCC için Türkiye’de yapılan daha önceki çalışmalarda Erkek: Kadın oranı 3,4:1 olarak raporlanmıştır (3). Bizim çalışmamıza göre HCC’nin erkeklerde görülme sıklığı Türkiye ortalamasının üstünde gibi görünse de, hasta sayısının fazla olduğu çok merkezli çalışmalar cinsiyet gibi özelliklerin belirlenmesinde daha değerli olacaktır. Hastalığın görülme yaşı literatürle benzer olarak 40 yaşından önce oldukça düşük bulunmuştur.

HCC gelişiminde etkili olan faktörlerin coğrafi farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. Genellikle kronik viral enfeksiyonun uzun dönem sonucu olarak ortaya çıkan HCC için gelişmekte olan ülkelerde kronik HBV enfeksiyonu etiyolojik faktörler arasında başı çekerken, gelişmiş ülkelerde HCV enfeksiyonu ön plana çıkmaktadır. Daha önce Türkiye’de yapılan ve HCC gelişiminden sorumlu etiyolojik faktörlerin belirlendiği çok merkezli bir çalışmada tek başına HBV enfeksiyonu varlığı % 40 oranla en sık etiyolojik neden olarak bildirilmiştir (11). Bizim çalışmamızda da etiyolojik nedenler arasında tek başına HBV enfeksiyonu varlığı olguların % 47,2’sinde bulunmuştur. Aflatoksin gibi çevresel karsinojenlerin de HCC gelişme riskini arttırdığı bilinmektedir. Ancak hasta grubumuzda aflatoksin maruziyeti bilinen birey olmadığından bu veriyi destekleyecek bulgu bulunamamıştır.

MS-MLPA, klasik MLPA’ya benzer biçimde, örneklerin prob hibridizasyonu ve ligasyon işlemleri sonrasında, elde edilen ürünlerin metilasyon spesifik enzimler ile kesimi ve takibinde PZR reaksiyonunun gerçekleştirilmesi esasına dayanır. Yöntem, ilk kez Prader

Willi/Angelman Sendromu olan hastaların tespitinde kullanılmasından sonra birçok araştırmacı tarafından kanser araştırmalarında tercih edilmeye başlanmıştır (87).

MS-MLPA yöntemi ile elde edilen verilerin analizi için üretici firma tarafından önerilen birçok farklı analiz yöntemi mevcuttur. Elde edilen elektroforez sonuçlarının hali hazırdaki kapiller elektroforez cihazlarında kullanılan bilgisayar yazılımları ile normalizasyonunu takiben, ticari olarak ulaşılabilen analiz programları kullanılabileceği gibi bireysel olarak hazırlanmış örnek sayfaları ile de analiz gerçekleştirilebilmektedir (85).

Ticari olarak hazırlanmış analiz programları metilasyon analizi için henüz yeterli görünmemektedir. Bunun yerine birçok çalışmada tercih edilen, araştırmacıların kendi hazırladıkları analiz yöntemleridir. Bu şekilde enzim kesim noktası içermeyen problemlere ait pik alanların ortalaması ya da toplamı referans olarak kabul edilmektedir. Böylece kesilmiş ve kesilmemiş örneklerde enzim kesim bölgesi içermeyen problemlerin her biri için elde edilen pik alanları bu referans değerlere bölünüp, değerler oranlandığında metilasyon oranı tespit edilmektedir. Araştırmacıların bir kısmı metilasyon değerinin 0,02'den büyük olduğu örneklerde metilasyon olduğunu kabul ederken, bir kısmı da diğer metilasyon belirleme yöntemleri ile metile buldukları değerlerin üstünde kalan değerleri metilasyon varlığı olarak kabul etmişlerdir (92, 93, 94). Bizim çalışmamızda da, daha önce bildirildiği gibi, her bir örnek için metilasyon değeri belirlenmiş, ek olarak sağlıklı karaciğer vericisi bireylere ait normal karaciğer dokusu örneklerinde de aynı prosedürler tekrarlanmıştır. Kontrol grubu ve hasta grubu örneklerinden elde edilen değerler arasında farklılık olmadığından kontrol grubu örnekleri temel bir metilasyon değeri belirlemek için seçilmiştir. Böylece her bir MLPA probu için kontrol örneklerinden elde edilen metilasyon değerlerinin ortalaması alınarak normal karaciğer dokusu için ortalama bir metilasyon değeri elde edilmiştir. Normal dokudaki metilasyon değerinin üzerinde bulunan hasta örneklerinde normal dokuya göre artmış metilasyon varlığı kabul edilmiştir. Sonuçlarımızın güvenilirliğini artırmak için ise, her gen için en az iki problemler artmış metilasyonun varlığının gösterildiği örneklerde, değerlendirilen gene ait promotor bölge hipermetilasyonu varlığı gösterilmiştir. HCC karsinogenezinde farklı aşamalarda etkili olduğu bilinen promotor bölge metilasyonu, özellikle tümör baskılayıcı genler olmak üzere birçok genin transkripsiyonunun baskılanması ile kanser gelişimine neden olur (43). Yapılan az sayıda çalışmada *MLH1*, *MSH3*, *MSH3* ve *MGMT* genlerinin promotor bölge metilasyonu HCC' li olgularda gösterilmiştir (95, 96, 97). Bizim çalışmamızda bu genlere ek olarak MMR sisteminde görevli *PMS2*, *MLH6* ve *MLH3* genlerine ait metilasyon profilleri de incelenmiştir. Buna göre MMR sisteminde

görevli yedi genden en az birinde metilasyon saptanan olguların oranı %48,2 olarak bulunmuştur. Sadece tek bir gende metilasyon saptanan % 23,2 olguya ek olarak, olguların %25'inde birden fazla gene ait metilasyon saptanmıştır. Bu oranlara bakıldığında aynı yolakta görevli birden fazla gene ait değişikliğin bir arada değerlendirilmesinin daha fazla bilgi vereceği öngörülmektedir.

DNA metilasyon profilinin rastgele olmayan dağılımını göstermek için yapılan çalışmalar sonrasında “*CpG island methylator phenotype (CIMP)*” olarak adlandırılan bir tanımlama geliştirilmiştir (98). İlk kez gastrik ve kolorektal kanserlerde (99, 100) gösterilen CIMP, kanser oluşum yollarından birden fazlasında görevli, özellikle tümör baskılayıcı genleri içeren gen gruplarında çok sayıda genin aynı anda metile olması olarak tanımlanmaktadır. HCC için yapılan ilk çalışmada CIMP+ tümörlerin çevresel faktörlere maruziyet ile ilişkisi gösterilmiştir (40). Yine yapılan başka bir çalışmada *p14*, *p15*, *p16*, *RASSF1A* ve *WT1* genlerine ait metilasyon profilleri değerlendirilmiş ve yüksek AFP değerleri ile CIMP pozitifliği arasında ilişki bulunmuştur (97). Başka bir çalışmada ise CIMP pozitifliği ile yüksek AFP düzeyleri, çok sayıda tümör varlığı ve kısa yaşam beklentisi arasında yüksek oranda ilişki bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada CIMP değerlendirmesinin transplantasyon sonrası tümör tekrarlama riskini göstermede iyi bir belirteç olacağı gösterilmiştir (101). Bizim çalışmamızda ise değerlendirilen 7 gen, aynı yolakta görev yapan ve DNA onarım mekanizmaları ile ilişki genlerdir. Bu nedenle çalışma grubumuzda CIMP pozitifliği ile ilgili bir değerlendirme yapılamamıştır.

Çalışmamızda sadece bir olguda (Olgu 5) tüm bölgelerde metilasyon tespit edilmiştir. Bu olguya HCC tedavisine yönelik karaciğer nakli uygulanmıştır. Hastanın klinik özelliklerine baktığımızda; operasyon öncesi CHILD C olarak değerlendirilen olgunun, AFP değerinin normalin üstünde olduğu, etiyolojik faktör olarak HBV enfeksiyonu olduğu ve TNM evrelemesine göre Evre 4A olarak değerlendirildiği öğrenilmiştir. Tümör histopatolojisine bakıldığında ise iyi derece differansiye tümörün multifokal olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ileri evrede saptanan bir tümör olması nedeniyle, metilasyonun karsinogenezde erken bir olay olduğu bilgisiyle çelişmekle birlikte bütün bölgelerde metilasyon saptanması ilerleyen süreçte metile olan gen sayısının artabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda en sık metilasyon saptanan gen 14 olgu (%25) ile *MSH3* geni olarak bulunmuştur. Ek olarak tek başına en fazla metile olan gen de 8 olgu ile *MSH3* geni olarak bulunmuştur. HCC' li olgularda yapılan iki farklı çalışmanın birinde en fazla metilasyon

saptanan genler *MSH3* ve *MGMT* olarak belirlenirken, diğerk bir çalışmada HCC rneklerinin hiç birinde *MSH3* genine ait metilasyon saptanmamıştır (95, 97). Gelecekte HCC olgularında yapılacak olan metilasyon çalışmalarında farklı yolaklardaki genlere ek olarak *MSH3* geninin de değerlendirilmesi gerektiği görülmektedir.

Karsinogenez sırasında promotor hipermetilasyonunun erken bir olay olarak meydana geldiği bilinmektedir (82). HCC için yapılan hücre siklusunun devam ettirilmesinde görevli beş farklı genin metilasyon profilinin değerlendirildiği bir çalışmada, promotor bölge hipermetilasyonunun erken karsinogenez evrelerinde başladığı gösterilmiştir (102). Bizim alışmamızda ise incelenen genlerin en az birinde metilasyon saptanan örneklerde Grade ve TNM evresi açısından anlamlı farklılık bulunamamıştır. Buna rağmen diğerk evreleme sistemlerinde kullanılan tümör sayısına göre metilasyon durumları değerlendirildiğinde, tümör sayısı tek olan örneklerde daha fazla metilasyon olduğunun gösterilmesi metilasyonun erken bir olay olduğu görüşünü desteklemektedir. Çalışmamızda normal ve/veya sirotik dokularda metilasyon varlığı değerlendirilmemiştir. Bu nedenle promotor metilasyonunun karsinogenezin öncesinde ortaya çıkan ve karsinogenezi başlatan bir olay olduğu ileri sürülememektedir.

Yapılan alışmalarda HCC etiyolojisinde rol oynayan viral hepatitler ile tümör metilasyonu karşılaştırdığında, bu etiyolojik faktörlerin bulunduğu bireylerde metilasyonun bulunmayan bireylere göre belirgin derecede farklı olduğunu gösterilmiştir (103, 104). Bilgimiz dahilinde, çalışmamızda yer alan genlerin tümünün HBV ya da HCV infeksiyonu varlığı ile birlikte değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda HBV ile *PMS2* metilasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. HBV' nin karsinogenezdeki rolü ile *PMS2* arasındaki ilişki bilinmemektedir. Bundan sonraki çalışmalarda bu ilişkinin araştırılması önerilmektedir. Diğerk genler ve HBV pozitifliği ile tüm genler ve HCV pozitifliği arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Bundan sonraki çalışmalarda, viral hepatit olup henüz HCC geliştirmemiş örneklerde de MMR genlerinin metilasyonunun değerlendirilmesi uygun olacaktır.

AFP düzeyi, kronik karaciğer hastalığı nedeniyle takip edilen hastalarda HCC gelişimini göstermede kullanılan önemli bir belirteçtir. HCC için, daha önce yapılan çalışmalarda farklı genlerde metilasyon durumları ile AFP düzeyleri karşılaştırılmamıştır. Yapılan iki farklı çalışmada CIMP pozitifliği ile AFP düzeyleri arasında ilişki gösterilmiştir (97, 101). Bu çalışmaların her ikisinde de hücre döngüsü kontrolü ile ilişkili genlerin metilasyon

durumları değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise AFP yüksekliği ve metilasyon durumları arasında ilişki bulunmazken, AFP düzeyi ortalamalarına bakıldığında *MSH6* geni metilasyonu için AFP artmış metilasyon ve artmış AFP'nin istatistiksel olarak anlamlı birlikteliği gösterilmiştir. DNA onarımı ile ilişkili genlerin metilasyonu ile AFP ifadenmesinin ilişkisine yönelik çalışmalar henüz yapılmamış ise de beklenmeyen bir bulgu olmadığı düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda belirlediğimiz AFP yüksekliği ve metilasyon ilişkisinin ise daha ayrıntılı, özellikle gen ifadenme düzeylerini de içeren çalışmalarla desteklenmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

E. coli' de MutL geninin insandaki homoloğu olan *MLH1*, herediter nonpolipozis kolon kanserinde sıklıkla mutasyona uğrayan bir gendir. Sıklıkla gen ifadenmesinin baskılanmasıyla sonuçlanan *MLH1* promotor bölge metilasyonu endometrium kanseri, kolon kanseri ve gastrik kanserlerde gösterilmiştir (54, 105).

HCC olgularında yapılan çalışma sayısı az olmakla birlikte, çalışmaların sonuçları da birbirini desteklemekten uzak görünmektedir. Bu az sayıdaki çalışmalardan birinde *MLH1* promotor metilasyonu HCC olgularda oldukça nadir saptanırken (95), bir diğer çalışmada sık görülen bir epigenetik değişiklik olarak gösterilmiştir (97). Bizim çalışmamızda olguların %17,9' unda *MLH1* promotor metilasyonu saptanmış, ancak klinik bulgularla ilişki gösterilememiştir.

Başka bir çalışmada ise azalmış *MLH1* ifadenmesi tespit edilen olgularda metilasyon saptanmamış, kolon kanseri olgularında da metilasyon olmaksızın, mutasyonlara bağlı olarak ifadenmenin azaldığı tartışılmıştır (96). Bizim çalışmamızda gen ifadenme düzeyleri incelenmediğinden böyle bir karşılaştırma yapılamamıştır. Bu nedenle sonraki çalışmalarda gen metilasyon analizlerine ek olarak genlerin ifadenme düzeylerinin değerlendirilmesinin patogenezi ve etki mekanizmasını açıklamada faydalı olacağı düşünülmüştür.

Çalışmamızda *MLH1* geninin metilasyonu en sık *MLH3* geni ile ilişkili bulunmuştur. *E. Coli*' de MutL proteinin homoloğu olan bu genlerin benzer işlevleri nedeniyle aynı anda metile olmaları olası görünmektedir. Daha önce HCC tümör dokuları ve hücre dizilerinde *MLH1* ve *MLH3* metilasyonlarının değerlendirildiği bir çalışmada *MLH3* metilasyonu gösterilememiştir. Gelecekte planlanacak çalışmalarda *MLH3* geni metilasyonun da değerlendirilmesi gerektiğini göstermesi açısından bulgumuz önemlidir.

PMS2 genindeki mutasyonlar sonucu herediter nonpolipozis kolon kanseri, Turcot Sendromu ve supratentoryal primitif nöroektodermal tümörler gibi neoplazmların oluştuğu bilinmektedir. *PMS2* geni metilasyonu ile ilgili çalışmalar diğer MMR genlerindeki çalışmalara göre oldukça az sayıdadır. Daha önce gastrik kanserlerde yapılan bir çalışmada örneklerin %28,6 'sında *PMS2* promotor bölge metilasyonu tespit edilmiş ve gastrik kanserin farklı patolojik tipleri ile ilişkisi ortaya koyulmuştur (106).

HCC olgularında *PMS2* gen ifadenmesinin azaldığını gösteren bir yayının bulunmasına rağmen (39) , literatür bilgimize göre çalışmamız HCC olgularında *PMS2* promotor hipermetilasyonunu gösteren ilk çalışmadır. Metilasyon oranının %14,3 bulunduğu örneklerimizde; Child sınıfı, tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından anlamlı ilişki saptanmıştır. Sonuçlarımıza göre *PMS2* metilasyonunun beklendiği üzere hepatokarsinogenezin başlangıcında etkili olduğu görülmektedir. *PMS2* promotor metilasyonu en fazla *MGMT* geni metilasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Her ne kadar iki farklı DNA tamir mekanizmasında görevli olsalar da, ileride yapılacak çalışmalarda bu iki genin birlikte değerlendirilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

Mutasyonları herediter nonpolipozis kolon kanseri olgularında gösterilmiş bir diğer gen olan *MSH6*, *MSH2* ile birlikte yanlış eşleşme tanıma kompleksini oluşturmaktadır. Daha önce ilk kez gastrik kanser olgularında yapılan bir çalışmada, örneklerin hiçbirinde *MSH6* metilasyonu tespit edilmemiştir (106). HCC ile *MSH6* ilişkisi ilk kez gen ifadenme düzeylerinin belirlendiği bir çalışmada ortaya konmuş ve *MLH6* ifadenmesinin azalması HCC ile ilişkili bulunmuştur (39). *MLH6* metilasyonu ve HCC ilişkisi daha önce değerlendirilmemiştir. Bizim çalışmamızda örneklerin %17,9' unda *MSH6* metilasyonu gösterilmiştir. Daha önceki çalışmada gösterilen HCC örneklerinde *MLH6* ifadenmesinin azalması, çalışmamızın sonuçları ile bir arada düşünüldüğünde; *MSH6* metilasyonunun genin transkripsiyonunu baskıladığı ve bunun bir sonucu olarak gen ifadenmesinin azaldığı düşünülmektedir.

Ayrıca Zekri ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, *MSH6* geninin diğer genlerin ifadenmesinin azalmasına örneklerin büyük bir çoğunluğunda eşlik ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle özellikle HCV enfeksiyonunun varlığında MMR genlerinde oluşan fonksiyon bozukluğunun başlamasında *MSH6*' nın önemli bir basamak olduğu düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda da değerlendirilen genlerden beşi için *MSH6* geni ile korelasyon bulunmuştur. Önceki çalışmadaki bulgu ile uyumlu olduğu düşünülen bu sonuç ile ilgili,

yazarların yorumlarına ek olarak *MSH6* geninin MMR genlerindeki metilasyon profilini belirlemede tek başına da kullanılabilmesi düşünülmektedir.

MSH2 geni mutasyonları, *MLH1* geni ile birlikte polipozis olmayan kalıtsal kolon kanseri olgularının %90' ında saptanmaktadır (62). *MSH2* metilasyonu daha önce farklı kanser türlerinde ve HCC'de gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada HCC'li örneklerde *MSH2* metilasyonu %68 oranında bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise sadece 1 örnekte *MSH2* metilasyonu saptanmış ve klinik ve histopatolojik parametreler için anlamlı ilişki saptanmıştır. Buna rağmen tek hastada metilasyon saptamamız nedeniyle sonuçların yorumlanması güç olacaktır.

MGMT doğrudan DNA onarımında görevli ve karaciğerde yüksek aktivite gösteren bir enzimdir. CpG adacık metilasyonu sonrasında *MGMT* ifadenmesinin azalması ya da kaybı birçok insan kanserinde gösterilmiştir. Daha önce Multiple Myelom olgularında yapılan bir çalışmada az sayıda olguda *MGMT* metilasyonu %40 olarak bildirilmiştir (83). Gliom olgularında yapılan bir çalışmada ise *MGMT* promotor metilasyonunu %40 oranında saptanmış ve *MGMT* hipermetilasyonunun yaş, evre, tümör grade'i ve hastanın performansından daha güçlü bir bağımsız prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (107). HCC' de ise, özellikle kronik viral hepatit sonrası kanserlerle ilişkili olmak üzere, metilasyon varlığı %22-39 oranında belirlenmiştir (96, 108). HCC ile karşılaştırıldığında neoplastik olmayan karaciğer dokusunda benzer oranda *MGMT* promotor metilasyonu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda % 21,4 örnekte *MGMT* promotor metilasyonu tespit edilmiş ancak klinik ve histopatolojik parametreler için anlamlı farklılık saptanmamıştır. Hastalarımızın tümünde klinik verilerin elde edilememesi çalışmamızın kısıtlılığı olarak karşımıza çıkmaktadır. *MGMT* geni için en yüksek korelasyon önceki çalışmalarla uyumlu biçimde *MSH6* geni ile bulunmuştur (39). Daha önce yapılan çalışmalarda böyle bir değerlendirme yapılmadığından sonuçlarımızı yorumlamak mümkün olmamaktadır. Diğer tümörlerde de MMR sistemine ait bu genlerin metilasyonun değerlendirilmesi uygun görülmektedir.

MSH3 geni MMR sisteminde görev yapan ve mutasyonlarının endometrium kanserinde sorumlu gösterildiği bir genidir. Daha önce yapılmış HCC'de yapılmış çalışmalarda %75 gibi yüksek oranlarda *MSH3* metilasyonu tespit edilmiştir. Daha az oranda da sirotik karaciğer dokusunda *MSH3* metilasyonu gösterilirken normal dokuda gösterilememiştir (95, 96, 97).

MSH3, *MSH2* geni ile heterodimer oluşturarak fonksiyon görmektedir. Bizim çalışmamızda ilginç bir bulgu olarak *MSH3* geni metilasyonunun en çok korelasyon gösterdiği genler yine MMR sisteminde görevli ancak *E coli*'de MutL homologu olan *MLH1* ve *MLH3* genleridir.

MLH3 genindeki somatik mutasyonlar Lynch Sendromu ve endometrium kanseri gibi tümörlerde gösterilmiştir. Literatür bilgilerine göre daha önce insan tümörlerinde *MLH3* metilasyonun değerlendirildiği bir çalışma yapılmamıştır. Bizim çalışmamızda %14,3 olguda *MLH3* genine ait metilasyon tespit edilmiştir. Klinik ve histopatolojik bulgular açısından ise anlamlı ilişki saptanmamıştır. *MLH3* genine ait metilasyon taramalarının farklı kanserlerde ve normal karaciğer dokusunda da yapılması ve ifadenme düzeyleri ile karşılaştırılması uygun olacaktır.

MS-MLPA, 2005 yılında ilk kullanıma girmesini takiben metilasyon tarama yöntemleri arasında yerini almış ve gün geçtikçe kullanım alanı arttırılmıştır. Yöntemin diğer metilasyon tarama yöntemlerine göre üstünlüklerinin başında, bisülfid dönüşümüne gereksinim duymaması gelmektedir. Bisülfid dönüşümü sırasında DNA'nın önemli bir kısmının degrade olması önemli bir dezavantajdır. Ayrıca yöntemin uygulama süresinin uzamasına da neden olmaktadır. Bizim çalışmamızda her bir örnek için 150 ng/µl DNA örneği kullanılmıştır. DNA izolasyonu ticari izolasyon kiti kullanılarak yapılmış ve analiz aşamasında örneklerin büyük çoğunluğunda kullanılan DNA miktarının yeterli olduğu gözlenmiş, çok az sayıda örneğin tekrarına gereksinim duyulmuştur (veriler gösterilmedi).

MLPA yönteminin yeni kullanıma girmesi nedeniyle dezavantaj olarak karşımıza çıkan özellik, veri analizinde yaşanan sıkıntılar olmaktadır. Kişisel uygulamaların devreye girmesi, yoruma dayalı analiz yöntemlerinin kullanılması ve daha önce yapılan çalışma sayısının sınırlı olması nedeniyle sonuçların yorumlanması güçleşmektedir. Yeni nesil moleküler uygulamalarında olduğu gibi MLPA analizi için geliştirecek ve devamlı güncellenen yazılımların ortaya çıkarılması uygulaması basit ve ucuz olan bu yöntemin kullanım alanını genişletecektir.

Kanser patogeneziye yönelik yapılan araştırmalarda, hastalığın farklı dönemlerinde alınan örneklerin ve beraberinde öncül lezyonların sonuçlar ile birlikte değerlendirilmesi araştırmanın gücünü arttırmaktadır. Bunun için değerlendirilen örneklere ait klinik verilerin kapsamlı olması önemlidir. çalışmamızda kullanılan örnekler arşiv

materyallerinden elde edilmiştir. Bu nedenle geriye dönük yapılan dosya taramalarında klinik verilerin tamamına ulaşılamamış ve bu durum çalışmanın zayıf yönü olarak düşünülmüştür. Yapılan istatistiksel analizler sonrasında veri sayısının az olduğu değerlendirmeler için sonuçların güvenilirliği düşük bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda prekanseröz lezyonlarda metilasyon taraması yapılmamıştır. İleriki çalışmalarda HCC' ye ek olarak etiyolojik faktörlerin (Örn. Viral hepatit) varlığı bilinen kanser geliştirmemiş dokuların ve özellikle sirotik karaciğer örneklerinin değerlendirilmesi planlanmaktadır.

HCC' nin agresif seyirli ve yaşam beklentisi oldukça kısa bir tümör olması nedeni ile tedavi edici yöntemlerin yanı sıra semptomların giderilmesine yönelik yöntemler de sıklıkla kullanılmaktadır. Etkili tedavi yöntemlerinin uygulanmasından sonra bile hücresel düzeyde hastalık yayılımının önlenememesi nedeniyle hastalığın rekürensisi söz konusu olabilmektedir. Hücresel düzeyde uygulanabilecek tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için moleküler mekanizmaların içerisinde tanımlanacak epigenetik değişikliklerin ortaya çıkarılması faydalı olacaktır.

Metilasyon ve kanser ilişkisinin ayrıntılı çalışmaları tanımlandığı günümüzde HCC gelişiminin hangi basamaklarında bu mekanizmaların etkili olduğunun gösterilmesi, HCC patogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi ve yeni tarama ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesi açısından önemlidir. MMR sisteminde görevli genlerin tümüne ait metilasyon durumlarının, geniş ve karşılaştırmalı çalışmalar ile gösterilmesi yeni yaklaşımların önünü açacaktır. MS-MLPA yönteminin ucuz, kolay uygulanabilir ve çok sayıda genin bir arada değerlendirmesini sağlayan bir yöntem olma özelliği ile metilasyon çalışmalarında kullanımının faydalı olacağına inanmaktayız.

6. SONUÇLAR

- ✓ Çalışmamızda DNA onarım mekanizmalarında görevli *MLH1*, *PMS2*, *MSH6*, *MSH2*, *MGMT*, *MSH3* ve *MLH3* genlerinin tümünde farklı oranlarda metilasyon saptanmıştır.
- ✓ Tümör sayısı ve incelenen genlerden en az birinde artmış metilasyon varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.
- ✓ Metilasyonu değerlendirilen *MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MGMT* ve *MLH3* genlerinden herhangi birinin metilasyonu durumunda *MSH6* geninde de metilasyon saptanması ilginç bir bulgudur,
- ✓ Çalışmamız *PMS2* metilasyonunun HCC olgularında gösterildiği ilk çalışmadır ve *PMS2* metilasyonu saptanan örneklerde HBV pozitifliği, Child sınıfı, tümör sayısı, Grade ve TNM evresi açısından anlamlı ilişki saptanmıştır.
- ✓ *MLH6* metilasyonu ve HCC ilişkisi ilk kez bu çalışmada değerlendirilmiş ve HCC'li örneklerde *MLH6* metilasyonu varlığı gösterilmiştir.
- ✓ Sadece tek örnekte *MSH2* metilasyonu saptanmış ve klinik ve histopatolojik parametreler için anlamlı farklılık saptanmıştır.
- ✓ Literatür bilgilerine göre insan tümörlerinde *MLH3* metilasyonunun değerlendirildiği ilk çalışma olmuştur.
- ✓ MS-MLPA uygulaması basit ve maliyeti düşük bir yöntem olmakla birlikte veri analizinde karşılaşılan güçlüklerin ortadan kaldırılması güçlüklerin ortadan kaldırılması yöntemin kullanım alanını genişletecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Yu MC, Yuan JM, Govindarajan S, Ross RK . Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Can J Gastroenterol* 14(8):703-709, 2000.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94(2):153-156, 2001.
3. Alacacioglu A, Somali I, Simsek I, Astarcioglu I, Ozkan M, Camci C, Alkis N, Karaoglu A, Tarhan O, Unek T, Yilmaz U. Epidemiology and survival of hepatocellular carcinoma in Turkey: outcome of multicenter study. *Jpn J Clin Oncol* 38(10):683-688, 2008.
4. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 362(9399):1907-1917, 2003
5. Sun Z, Lu P, Gail MH, Pee D, Zhang Q, Ming L, Wang J, Wu Y, Liu G, Wu Y, Zhu Y. Increased risk of hepatocellular carcinoma in male hepatitis B surface antigen carriers with chronic hepatitis who have detectable urinary aflatoxin metabolite M1. *Hepatology* 30(2):379-383,1999.
6. Prevention of liver cancer. WHO technical series, Vol 691. Geneva World Health Organization, 1983.
7. Vogelstein B, Kinzler KW. *The Genetic Basis of Human Cancer*, Second Edition. USA. McGraw Hill, 2002.
8. Brechot C, Kremsdorf D, Soussan P, Pineau P, Dejean A, Paterlini-Brechot P, Tiollais P. Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): molecular mechanisms and novel paradigms. *Pathol Biol* 58(4):278-287, 2010.
9. Yeh FS, Yu MC, Mo CC, Luo S, Tong MJ, Henderson BE. Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in southern Guangxi, China. *Cancer Res* 49(9):2506-2509, 1989.

10. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 2(8256):1129-1133,1981.
11. Uzunalimoglu O, Yurdaydin C, Cetinkaya H, Bozkaya H, Sahin T, Colakoglu S, Tankurt E, Sarioglu M, Ozenirler S, Akkiz H, Tozun N, Degertekin H, Okten A. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Turkey. *Dig Dis Sci* 46(5):1022-1028, 2001.
12. IARC monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans, vol 59. Hepatitis viruses. Lyon: International Agency for researchon cancer, 1994.
13. Yuan JM, Govindarajan S, Henderson BE, Yu MC. Low prevalence of hepatitis C infection in hepatocellular carcinoma (HCC) cases and population controls in Guangxi, a hyperendemic region for HCC in the People's Republic of China. *Br J Cancer* 74(3):491-514, 1996.
14. Stoloff L. Aflatoxin as a cause of primary liver-cell cancer in the United States: a probability study. *Nutr Cancer* 5(3-4):165-186, 1983.
15. Wang JS, Huang T, Su J, Liang F, Wei Z, Liang Y, Luo H, Kuang SY, Qian GS, Sun G, He X, Kensler TW, Groopman JD. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing Village, Fusui County, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10(2):143-146, 2001.
16. Wogan GN. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Res* 52(7):2114-2118, 1992.
17. Ross RK, Yuan JM, Yu MC, Wogan GN, Qian GS, Tu JT, Groopman JD, Gao YT, Henderson BE. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet* 339(8799):943-946, 1992.
18. Qian GS, Ross RK, Yu MC, Yuan JM, Gao YT, Henderson BE, Wogan GN, Groopman JD. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3(1):3-10, 1994.

19. McGlynn KA, Rosvold EA, Lustbader ED, Hu Y, Clapper ML, Zhou T, Wild CP, Xia XL, Baffoe-Bonnie A, Ofori-Adjei D, et al. Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(6):2384-7238, 1995.
20. Chen CJ, Yu MW, Liaw YF, Wang LW, Chiamprasert S, Matin F, Hirvonen A, Bell DA, Santella RM. Chronic hepatitis B carriers with null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms who are exposed to aflatoxin are at increased risk of hepatocellular carcinoma. *Am J Hum Genet* 59(1):128-134.
21. Kew, MC. Tumors of the liver. In: *Hepatology: A textbook of liver disease*, Zakim, D, Boyer, T (Eds), WB Saunders Company, Philadelphia 1996. p.1513.
22. Bruix, J, Sherman, M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*; 42:1208. 1245, 2005.
23. Gogel BM, Goldstein RM, Kuhn JA, McCarty TM, Donahoe A, Glastad K. Diagnostic evaluation of hepatocellular carcinoma in a cirrhotic liver. *Oncology (Williston Park)* 14(6 Suppl 3):15-20, 2000.
24. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, Robbins Temel Patoloji. 6'ncı Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2000.
25. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Christensen E, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. *J Hepatol* 35:421–430, 2001.
26. Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, Nakajima Y, Ohnishi K. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 56:918, 1985.
27. The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. Prospective validation of the CLIP score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 31:840, 2000.
28. Llovet, JM, Bru, C, Bruix, J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 19:329, 1999.

29. Moinzadeh P, Breuhahn K, Stützer H, Schirmacher P. Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade results of an explorative CGH meta-analysis. *Br J Cancer* 92(5):935-941, 2005.
30. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 350: 429-431,1991.
31. Haber DA, Housman DE. Rate-limiting steps: the genetics of pediatric cancers. *Cell* 64: 5-8 , 1991.
32. Scorsone KA, Zhou YZ, Butel JS, Slagle BL. p53 mutations cluster at codon 249 in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinomas from China. *Cancer Res* 52: 1635-1638, 1992.
33. Teufel A, Staib F, Kanzler S, Weinmann A, Schulze-Bergkamen H, Galle PR. Genetics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 13(16):2271-2282, 2007.
34. Hosono S, Chou MJ, Lee CS, Shih C. Infrequent mutation of p53 gene in hepatitis B virus positive primary hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 8: 491-496, 1993.
35. Jaskiewicz K, Chasen MR. Differential expression of transforming growth factor alpha, adhesions molecules and integrins in primary, metastatic liver tumors and in liver cirrhosis. *Anticancer Res* 15: 559-562, 1995.
36. Teramoto T, Satonaka K, Kitazawa S, Fujimori T, Hayashi K, Maeda S. p53 gene abnormalities are closely related to hepatoviral infections and occur at a late stage of hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 54: 231-235, 1994.
37. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 27:55–76, 2007.
38. Boyault S, Rickman DS, de Reyniès A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, Hérault A, Saric J, Belghiti J, Franco D, Bioulac-Sage P, Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 45:42–52, 2007.

39. Zekri AR, Sabry GM, Bahnassy AA, Shalaby KA, Abdel-Wahabh SA, Zakaria S. Mismatch repair genes (hMLH1, hPMS1, hPMS2, GTBP/hMSH6, hMSH2) in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 11(20):3020-3026, 2005.
40. Shen L, Ahuja N, Shen Y, Habib NA, Toyota M, Rashid A, Issa JP. DNA methylation and environmental exposures in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 94(10):755-761, 2002.
41. Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Shuda M, Tanaka K, Arai M, Yamamoto M. Genetic and epigenetic events in human hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 18(6):1271-1278, 2001.
42. Lee S, Lee HJ, Kim JH, Lee HS, Jang JJ, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol.* 163(4):1371-1378, 2003.
43. Cornellà H, Alsinet C, Villanueva A. Molecular Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Alcohol Clin Exp Res* doi: 10.1111/j.1530-0277.2010.01406.x, 2011.
44. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics 3*. Third edition, UK, Garland, 2004.
45. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, New York, Garland Science, 2002.
46. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 4:296–307, 2004.
47. A.E. Pegg, M.E. Dolan, R.C. Moschel, Structure, function, and inhibition of *O*6-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol* (51) 167–223, 1995.
48. Rasouli-Nia A, Sibghat U, Mirzayans R, Patersonand MC, Day 3rd, On the quantitative relationship between *O*6-methylguanine residues in genomic DNA and production of sister-chromatid exchanges, mutations and lethal events in a Mer-human tumor cell line, *Mutat. Res* (314) 99–113, 1994.

49. Erickson LC, Laurent G, Sharkey NA, Kohn KW. DNA cross-linking and monoadduct repair in nitrosourea-treated human tumour cells. *Nature* (288) 727–729, 1980.
50. Daniels DS, Woo TT, Luu KX, Noll DM, Clarke ND, Pegg AE, Tainer JA. DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT. *Nat. Struct. Mol. Biol* (11) 714–720, 2004.
51. Gerson SL, Trey JE, Miller K, Berger NA. Comparison of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues, *Carcinogenesis* (7) 745–749, 1986.
52. Costello JF, Futscher BW, Tano K, Graunkeand DM, Pieper RO. Graded methylation in the promoter and body of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. *J. Biol. Chem* (269) 17228–17237, 1994.
53. Qian XC, Brent TP. Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res* (57) 3672–3677, 1997.
54. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary Human neoplasia. *Cancer Res* (59) 793–797, 1999.
55. Jacinto FV, Esteller M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair (Amst)* 6(8):1155-1160, 2007.
56. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
57. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18(1):85-98, 2008
58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (Erişim Tarihi : 18/04/2011)

59. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 57: 808–811, 1997.
60. Capel E, Fléjou JF, Hamelin R. Assessment of MLH1 promoter methylation in relation to gene expression requires specific analysis. *Oncogene* 26(54):7596-7600, 2007.
61. Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev* 129(7-8):391-407, 2008.
62. Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Human Molecular Genetics* 10:735–740, 2001.
63. Silva FC, Valentin MD, Ferreira Fde O, Carraro DM, Rossi BM. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. *Sao Paulo Med J* 127(1):46-51, 2009.
64. Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis*. 27(6):1121-1125, 2006.
65. Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin* 60(6):376-392, 2010.
66. Strahl DB, Allis D. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41-45, 2000.
67. Grant AP. A tale of histone modifications. *Genome Biol* 2:1-6, 2001.
68. Peterson LC, Laniel M. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14:546-51, 2004.
69. Lizuka M, Smith MM. Functional consequences of histone modifications. *Curr Opin Genet Dev* 13:154-160, 2003.
70. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev*. 12:599-606, 1998.
71. Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294(5543):797-799, 2001.

72. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358(11):1148-1159, 2008.
73. Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, Holtan N, Hanigan CL, Duan H, Domann FE. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet* 31:175-179, 2002.
74. Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Semin Cancer Biol* 12:389-398, 2002.
75. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 28(10):1057-1068, 2010.
76. Sayın DB, Metilasyon ve Kanser, *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2008, 28:513-524
77. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301(5895):89-92, 1983.
78. Fraga MF, Herranz M, Espada J, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Erkek E, Bozdogan O, Peinado H, Niveleau A, Mao JH, Balmain A, Cano A, Esteller M. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res* 64(16):5527-5534, 2004.
79. Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 83:155-158, 1989.
80. Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allelespecific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 48:880-888, 1991.
81. Zhu J, Yao X. Use of DNA methylation for cancer detection and molecular classification. *J Biochem Mol Biol* 40:135-141, 2007.
82. Fraga MF, Esteller M. DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* 33(3):632, 634, 636-649, 2002.

83. Yureğir ÖÖ, Multiple Myleom olgularında p16, MGMT, DAPK,E-Kaderin metilasyon kalıplarının belilenmesi, Uzmanlık tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, 2007.
84. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 15;30(12):e57, 2002.
85. [85.http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=fNPBLedDVp38p\CxU2h0mQ](http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=fNPBLedDVp38p\CxU2h0mQ) (Erişim tarihi : 18/04/2011)
86. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 16;33(14):e128, 2005.
87. Jeuken J, Cornelissen S, Boots-Sprenger S, Gijzen S, Wesseling P. Multiplex ligation-dependent probe amplification: a diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors. *J Mol Diagn* 8(4):433-443, 2006.
88. *Predictive Analytics Software (PASW)*, SPSS Inc., Chicago, IL, United States.
89. Cancer Facts & Figures 2010, American Cancer Society, Surveillance Research, (2010).<http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/CancerFactsFigures/cancer-facts-and-figures-2010>) Erişim Tarihi :18/04/2011
90. Bora G, Yurter HE, Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları, *Hacettepe Tıp Dergisi* 38:48-54, 2007.
91. U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> Erişim tarihi: 18/04/2011
92. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M, van der Lee-Haarloo CR, Hegi M, Jeuken JW, Ibdaih A, Brandes AA, Taphoorn MJ, Frenay M, Lacombe D, Gorlia T, Dinjens WN, Kros JM. MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a

- report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol* 10;27(35):5881-5886, 2009.
93. Jensen LH, Dysager L, Lindebjerg J, Kølvrå S, Byriel L, Crüger DG. Molecular biology from bench-to bedside - which colorectal cancer patients should be referred for genetic counselling and risk assessment. *Eur J Cancer* 46(10):1823-1828, 2010
 94. Gylling A, Ridanpää M, Vierimaa O, Aittomäki K, Avela K, Kääriäinen H, Laivuori H, Pöyhönen M, Sallinen SL, Wallgren-Pettersson C, Järvinen HJ, Mecklin JP, Peltomäki P. Large genomic rearrangements and germline epimutations in Lynch syndrome. *Int J Cancer* 124(10):2333-2340, 2009.
 95. Park JH, Cho SB, Lee WS, Park CH, Joo YE, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Lee JH, Kim SJ. Methylation pattern of DNA repair genes and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma. *Korean J Gastroenterol* 48(5):327-333, 2006.
 96. Matsukura S, Soejima H, Nakagawachi T, Yakushiji H, Ogawa A, Fukuhara M, Miyazaki K, Nakabeppu Y, Sekiguchi M, Mukai T. CpG methylation of MGMT and hMLH1 promoter in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis viral infection. *Br J Cancer* 88(4):521-529, 2003.
 97. Zhang CJ, Li HM, Yau LM, Suen KW, Zhou GY, Yu F, Liew CT. Methylation of mismatch repair gene (MMR) in primary hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 33(5):433-436, 2004.
 98. Tischoff I, Tannapfe A. DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 14(11):1741-1748, 2008.
 99. Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, Baylin SB, Issa JP. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 59(21):5438-5442, 1999.
 100. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(15):8681-8686, 1999.

101. Wu LM, Zhang F, Zhou L, Yang Z, Xie HY, Zheng SS. Predictive value of CpG island methylator phenotype for tumor recurrence in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *BMC Cancer* 10:399, 2010.
102. Roncalli M, Bianchi P, Bruni B, Laghi L, Destro A, Di Gioia S, Gennari L, Tommasini M, Malesci A, Coggi G. Methylation framework of cell cycle gene inhibitors in cirrhosis and associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 36(2):427-432, 2002.
103. Lambert MP, Paliwal A, Vaissière T, Chemin I, Zoulim F, Tommasino M, Hainaut P, Sylla B, Scoazec JY, Tost J, Herceg Z. Aberrant DNA methylation distinguishes hepatocellular carcinoma associated with HBV and HCV infection and alcohol intake. *J Hepatol* 54(4):705-715, 2011.
104. Hernandez-Vargas H, Lambert MP, Le Calvez-Kelm F, Gouysse G, McKay-Chopin S, Tavtigian SV, Scoazec JY, Herceg Z. Hepatocellular carcinoma displays distinct DNA methylation signatures with potential as clinical predictors. *PLoS One*. 5(3):e9749, 2010.
105. Fleisher AS, Esteller M, Tamura G, Rashid A, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Nishizuka S, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ.. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. *Oncogene* 20(3):329-335, 2001.
106. Moura Lima E, Ferreira Leal M, Cardoso Smith Mde A, Rodríguez Burbano R, Pimentel de Assumpção P, Bello MJ, Rey JA, Ferreira de Lima F, Casartelli C. DNA mismatch repair gene methylation in gastric cancer in individuals from northern Brazil. *Biocell*. 32(3):237-243, 2008.
107. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343(19):1350-4, 2000.
108. Zhang C, Li Z, Cheng Y, Jia F, Li R, Wu M, Li K, Wei L. CpG island methylator phenotype association with elevated serum alpha-fetoprotein level in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 13(3):944-952, 2007.