

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MELANOSİTİK NEVÜSLERDE VE MALİGN MELANOMDA OLASI GENETİK
DEĞİŞİKLİKLERİN VE MİKROSATELLİT İNSTABİLİTELERİNİN
SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER GENETİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

59935

AYŞEN TEZEL

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

İZMİR

1997

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MELANOSİTİK NEVÜSLERDE VE MALİGN MELANOMDA OLASI GENETİK
DEĞİŞİKLİKLERİN VE MİKROSATELLİT İNSTABİLİTELERİNİN
SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER GENETİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

AYŞEN TEZEL
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

59935

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF.DR. MERAL SAKIZLI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İZMİR

1997

"Melanositik nevüslerde ve malign melanomda olası genetik değışikliklerin ve mikrosatellit instabilitelerinin sitogenetik ve moleküler genetik yöntemlerle araştırılması" isimli tez 7.2.1997 tarihinde tarafımızdan değlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Jüri Başkanı
Prof.Dr.Meral SAKIZLI

M. Solak

Jüri Üyesi
Prof.Dr.Mustafa SOLAK

N. Atabeey

Jüri Üyesi
Doç.Dr. Neşe ATABEY

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi 0923.96.01.06 no'lu tez projesi olarak desteklenmiştir. Çalışmanın tamamı, Üniversitemizin Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı kollaborasyonu ile Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın Sitogenetik ve Moleküler Genetik laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın her aşamasında değerli desteğini büyük bir özveriyle bir an olsun esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Danışmanım Prof. Dr.Meral Sakızlı'ya, tüm yardımları için Doç.Dr.Sülen Sarıoğlu'na, Uzm.Dr. Erdener Özer'e ve Yahya T. Orhan'a, sitogenetik çalışmalarda in situ yöntemi ile ilgili yardımları ve değerlendirmeleri için Araş.Gör. Oğuz Altungöz'e, çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde yardımcı olan Araş.Gör. Kemal S. Korkmaz'a, Araş.Gör. Şenay Çelik'e ve Araş.Gör. Sefa Kızıldağ'a, çalışma sırasında teknik bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan kaçınmayan Doç.Dr. Neşe Atabey'e, Sitogenetik çalışma için dokuların klinik tanısında ve laboratuvara ulaştırılmasında yardımcı olan Yrd.Doç.Dr. Atay Atabey'e, çalışmanın kitapçık haline getirilmesinde Araş.Gör. Çiğdem Eresen'e ve Araş.Gör. Murat V. Yazıcıoğlu'na, çalışma sırasında her türlü laboratuvar gereksinimimi karşılayan teknisyenlerimiz Naime Erten'e ve Havva Güdük'e yardımları için gönülden teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER :

ÖZET	4
ABSTRACT	5
ŞEKİL LİSTESİ	6
TABLO LİSTESİ	8
KISALTMALAR	9
1. GİRİŞ VE AMAÇ	10
2. GENEL BİLGİLER	11
2.1 Melanosit Biyolojisi	11
2.1.1 Melanositik nevüsün oluşumu	11
2.1.2 Melanositik nevüslerin histolojik görünüşleri	12
2.1.3 Melanositik lezyonların sınıflandırılması	12
2.1.4 Bazı benign melanositik nevüsler	13
2.1.5 Malignansi riski taşıyan lezyonlar	13
2.1.5.1 Displastik nevüs (DN)	14
2.1.5.1.1 Displastik nevüsün klinik ve histolojik ayrımı	14
2.1.5.1.2 Displastik nevüste sitogenetik çalışmalar	15
2.1.5.2 Konjenital melanositik nevüs	16
2.1.5.2.1 Geniş (Dev) konjenital nevüs	17
2.1.5.2.2 Küçük konjenital nevüsler	17
2.1.5.3 Sonradan edinilmiş (acquired) melanositik nevüs	18
2.1.6 Melanositik sistemde neoplastik gelişimin evreleri (Tümör gelişimi)	19
2.1.7 Malign melanomun sınıflandırılması	20
2.1.7.1 Radyal Çoğalma Fazlı (RGP = Radial Growth Phase) malign melanom	20

2.1.7.2 Vertikal Çoğalma Fazlı (VGP = Vertical Growth Phase)	
malign melanom	21
2.1.7.3 Metastatik malign melanom	21
2.1.8 Hücre kültürü çalışmaları	22
2.1.8.1 Melanositlerin in vitro özellikleri	22
2.1.9 Melanositik hiperplazilerde biomarkerler	23
2.1.10 Malign melanomun klinik özellikleri ve erken tanının önemi	24
2.1.11 Melanositik lezyonların gelişiminde onkogenler ve tümör supresör genler	24
2.1.12 Nevüslerde ve malign melanomda sitogenetik çalışmalar	25
2.2 Mikrosatellit instabilitesi	26
2.2.1 Mikrosatellit instabilitesi ile ilgili ilk çalışmalar	28
2.2.2 Mikrosatellit instabilite markerlerinin kullanımı	30
2.2.3 Mikrosatellit instabilitesi ve tümörigenez	30
2.2.4 Malign melanom ve mikrosatellit instabilitesi	34
2.2.5 11 no'lu kromozomun malign melanom ile ilişkisi	34
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	36
3.1 Primer hücre kültürü ve sitogenetik analiz için kullanılan solüsyonlar	36
Kültür Ortamı	36
a- Melanositik nevüs kültürü için kültür ortamı	36
b-Malign melanom kültürü için kültür ortamı	37
3.1.1. Primer kültürün kurulması ve sitogenetik analiz için kullanılan yöntemler.....	39
Lamel üstünde üretilen hücrelerde uygulanan harvest (metafaz alanı eldesi) işlemi	40
Kromozom bantlama yöntemi	41
3.2 Mikrosatellit instabilitesinin tayini için kullanılan solüsyonlar	41
3.2.1 Mikrosatellit instabilitesinin tayini için kullanılan yöntemler	43

Parafin bloklardan DNA izolasyonu	43
3.2.2 Mikrosatellit markerleri	44
PCR Reaksiyonu	45
Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)	46
Gümüş nitrat ile boyama.....	47
Fotoğraflama	48
4. BULGULAR	49
4.1 Primer hücre kültürü ve sitogenetik analiz sonuçları	49
4.2 Melanositik nevüslerde ve malign melanomlarda mikrosatellit instabilite çalışma sonuçları	55
5. TARTIŞMA	66
6. KAYNAKLAR	70

ÖZET

MELANOSİTİK NEVÜSLERDE VE MALİGN MELANOMLARDA OLASI GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN VE MİKROSATELLİT İNSTABİLİTELERİNİN SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER GENETİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

AYŞEN TEZEL

Anahtar Kelimeler

Melanom, Nevüs, Sitogenetik, Heterozigosite kaybı, Mikrosatellit instabilitesi

Benign melanositik nevüs ve malign melanom (MM) oluşumuna neden olan genetik değişiklikler, tümörigenezin çok aşamalı genetik modeline uyum gösterir. Bu çalışmada, hem melanositik nevüs hem de melanom örneklerinden moleküler ve sitogenetik çalışmalar yapılarak; olası genetik değişikliklerin saptanması amaçlandı.

Dokuz MM, altı melanositik nevüs olmak üzere toplam onbeş vakanın doku örneklerinden hücre kültürü hazırlanarak sitogenetik analiz yapıldı. Melanositik nevüslerde sitogenetik olarak bir anomali belirlenmedi. Ancak iki MM örneğinden birinde 46,XX t (7;12) (q22;q24) t (2;11) (p25;q22) translokasyonları, diğerinde ise 47,XX + marker saptandı.

Dört displastik nevüs (DN), dört "compound" nevüs, yedi MM ve altı konjenital nevüs olmak üzere toplam 21 vakada parafin bloklardan izole edilen DNA örnekleri, dört ayrı mikrosatellit markeri kullanılarak PCR yöntemiyle amplifiye edildi. Denatüre edici jelde yürütüldükten sonra gümüş boyama yapıldı. Çalışılan dört ayrı markerin her birinde mikrosatellit değişimleri saptandı. D2S123 markerinde, iki MM dokusunda LOH (Heterozigosite kaybı), bir DN dokusunda MIN (Mikrosatellit instabilitesi); D14S65 markerinde bir DN dokusunda MIN; BAT40 markerinde bir DN dokusunda MIN; D11S29 markerinde bir MM dokusunda LOH ve bir DN dokusunda MIN saptandı. 21 örneğin 7'sinde (% 34), çalışılan mikrosatellit bölgelerinde genetik değişiklik saptandı. D2S123 markerinin "mismatch" tamir genlerine yakın bir yerde yerleşim göstermesi, bu vakalarda "mismatch" tamir genlerinde kayıp olabileceği ve bunun sonucunda replikasyon hatalarının ve MIN'lerin artabileceği şeklinde yorumlanabilir. İki ayrı örnekte D11S29 markerini tanımlayan 11.kromozomun 11q23.3 bölgesindeki genetik değişiklikler, diğer kanser türlerinde de etkili olduğu rapor edilen, bir tümör supresör genin bulunma olasılığını düşündürmektedir.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF MICROSATELLITE INSTABILITIES AND PROBABLE GENETIC ALTERATIONS IN MELANOCYTIC NEVI AND MALIGN MELANOMA BY CYTOGENETIC AND MOLECULAR GENETIC METHODS

AYŞEN TEZEL

Keywords

Melanoma, Nevus, Cytogenetic, Loss of Heterozygosity, Microsatellite instability

Genetic alterations which occur in benign melanocytic nevi and malignant melanoma (MM) follow the multistep genetic model of the tumorigenesis. In this study, it was aimed to find out probable genetic alterations in melanocytic nevi and melanoma samples by using the molecular and cytogenetic procedures.

Cytogenetic analysis was carried out via the cell cultures, prepared from nine MM and six melanocytic nevi, totally 15 different tissue samples. All of the melanocytic nevi was evaluated as cytogenetically normal. However, among the malignant melanoma cases, one had two clonal translocations 46,XX t (7;12) (q22;q24), t (2;11) (p25;q22), and the other case represented the karyotype of 47,XX + marker. The translocation breakpoints are in accordance with the similar findings in literature.

The DNA samples, isolated from totally 21 paraffin blocks; four dysplastic nevi (DN), four compound nevi, seven MM and six congenital nevi, were amplified with PCR method by using four different microsatellite markers. Silver staining was used to investigate the allelic bands, and the following changes was observed :

- i) LOH (Loss of heterozygosity) in two MM tissue and MIN (Microsatellite instability) in a DN tissue with D2S123 marker,
- ii) MIN in a DN tissue with D14S65 marker,
- iii) MIN in a DN tissue with BAT40 marker,
- iv) LOH in a MM tissue and MIN in a DN tissue with D11S29 marker.

Some genetic alterations was noticed in 7 out of 21 samples (34 %). D2S123 marker is localized nearby a mismatch repair gene and the LOH may contribute to the loss of repair gene activity. This finding is indicative of mutator phenotype. Genetic alterations (LOH and MIN) are found in two different cases with D11S29 marker as well. This result claims that a probable tumor suppressor gene that can affect some other cancer types, either, might be present at the 11q23.3 locus.

ŞEKİL LİSTESİ :

Şekil 1	Melanositlerin metastatik melanoma dönüşümünde bir tümör gelişim modeli ile ilgili kromozom bölgeleri ve genleri.....	19
Şekil 2	Onkogeneizde tümör supresör genler ve kademeli mutator yolları	33
Şekil 3	ST-96-0001 no'lu vakaya ait (malign melanom) 47,XX, + marker metafaz.....	51
Şekil 4	ST-96-0040 no'lu vakaya (malign melanom) ait translokasyon anomalisi gösteren karyotip örneği.....	52
Şekil 5	ST-96-0001 no'lu vakaya (malign melanom) ait normal karyotip örneği.....	53
Şekil 6	MMK-2 ortamında üretilen pigmente nevüse ait (ST-96-0030) primer hücre kültürü.....	54
Şekil 7	RPMI 1640 ortamında üretilen malign melanoma ait (ST-96-0040) primer hücre kültürü.....	54
Şekil 8	D2S123 markerinde 3 no'lu vakanın (malign melanom) tümör örneğinde heterozigosite kaybı.....	61
Şekil 9	D2S123 markerinde 16 no'lu vakanın displastik nevüs'ünde mikrosatellit instabilitesi	61
Şekil 10	D2S123 markerinde 22 no'lu vakanın (malign melanom) tümör örneğinde heterozigosite kaybı	62
Şekil 11	D14S65 markerinde 16 no'lu vakanın displastik nevüsünde mikrosatellit instabilitesi	62
Şekil 12	D11S29 markeri ile amplifiye edilmiş 12-22 vakaya ait örneklerin jeldeki görünüşleri	63

Şekil 13	D11S29 markerinde 5 no'lu vakanın tümör örneğinde heterozigosite kaybı.....	63
Şekil 14	D11S29 markerinde 16 no'lu vakanın displastik nevüs örneğinde mikrosatellit instabilitesi	64



TABLO LİSTESİ :

Tablo 1: İnsan melanosit sisteminde tümör gelişimi.....	20
Tablo 2 : Mikrosatellit markerlerinin özellikleri.....	44
Tablo 3 : Mikrosatellit markerleri ile kurulan PCR reaksiyonlarında kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları.....	45
Tablo 4 : Gümüş boyamada kullanılan maddeler ve inkübasyon süreleri.....	48
Tablo 5 : Melanositik nevüslerde ve malign melanomda primer hücre kültürü sonrası elde edilen sitogenetik analiz sonuçları	50
Tablo 6 : Seçilen parafin blokların ve olguların klinik-patolojik özellikleri.....	56
Tablo 7 : Melanositik nevüs ve malign melanom örneklerinin tümör dokularında (T) ve displastik nevüste (DN) saptanan çeşitli mikrosatellit lokuslarındaki değişimler.....	59
Tablo 8 : Pigmente nevüs ve malign melanom örneklerinin farklı lokuslarında gözlenen Heterozigosite kaybı (LOH) ve mikrosatellit instabilitesi'nin (MIN) değerlendirilmesi	65

KISALTMALAR :

CT	: Kolera toksini
dbcAMP	: Dibütiril siklik adenzin monofosfat
DN	: Displastik Nevüs
IBMX	: İzobütilmetil ksantin
LOH	: Heterozigosite kaybı (Loss of Heterozygosity)
MIN, MSI, MI	: Mikrosatellit instabilitesi
MMK - 2	: Melanosit Ortam Kiti - 2
MM	: Malign melanom
MMP	: Mikrosatellit Mutatör Fenotipi
MMR	: Mismatch Repair
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
RER	: Replikasyon hatası
RGP	: Radyal çoğalma fazı (malign melanom)
TPA	: 12 -o- tetradekanoyl-forbol-13-asetat
TSG	: Tümör supresör gen
USM	: "Ubiquitous" somatik mutasyon
VGP	: Vertikal çoğalma fazı (malign melanom)

1. GİRİŞ VE AMAÇ :

Yüzyıllar öncesinde, benler (nevüs), Avrupa leydileri arasında “güzellik benleri” olarak düşünölüyor ve hayranlık uyandırıyor. Ancak günümüzde, nevüslerin melanom ile ilişkisi olduğu düşünöldüğünden daha dikkatli ve farklı bir gözle bakılmaktadır. 1864 yılında Paget, kanserin nevüslerde veya nevüslerin altında oluştuğuna dikkat çekerken; 1947’de Traub, junctional nevüs ve melanom arasında bağlantı kurmuştur. 1985 yılında multipli atipik nevüslerin malign melanom öncülü olduğu tanımlanmıştır (1).

Cilt lezyonları arasında melanosit içeren nevüslere sık rastlanmaktadır. Her ne kadar benign nevüslerin melanoma dönüşümlerinde belli klinik özellikler (aynı lezyonda farklı renk, sınır düzensizliği, ülserasyon, vb.) görülürse de bazı olgularda benign ve malign olaylar karışabilmektedir. Örneğin, benign melanositik nevüsler, melanomla karışabilir. Melanositlerde oluşan genetik değışiklikler, malign transformasyona neden olabilmektedir. Bu konudaki bilgimiz oldukça sınırlıdır.

Melanomlarda yapılan sitogenetik araştırmalar sonucunda 1, 6, 7, 9, 10, 11 ve 17 no’lu kromozomlarda değışiklikler saptanmıştır (2). Ayrıca bu kromozomlar üzerinde lokalize olan protoonkogenlerin aktivasyonuna yönelik çalışmalar da vardır. Ancak hiç biri kesinlik kazanmamıştır. Ayrıca melanom oluşumuna neden olan gen / genler de tanımlanmamıştır. Bu bilinmeyenlere ışık tutabilmek amacıyla; laboratuvar olanaklarımız dahilinde benign melanositik nevüslerde, melanom riski taşıyan lezyonlarda ve malign melanomda sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalar yapmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER :

2.1 Melanosit Biyolojisi :

Nevüs terimi, konjenital deri lezyonların tanımlanmasında, özellikle de melanositik hücrelerden oluşan pigmente lezyonların tanımlanmasında kullanılmaktadır. Latin bir kelimeden köken alan nevüs terimi; epidermal nevüs, sebasöz (yağlı) nevüs ve flamöz (porto şarabı renginde) nevüs gibi olgun (mature) hücreli diğer konjenital lezyonları tanımlamada da kullanılmaktadır (3).

Nevüsler için, histolojik özellikleri çeşitlilik göstermesi bakımından, her yazar farklı bir terminoloji kullanmaktadır. Özellikle nevomelanositik nevüs, pigmente nevüs, melanositik nevüs gibi terimlerin kullanımı yaygındır. Burada terminolojik kargaşayı önlemek açısından sadece “melanositik nevüs “ terimi kullanılacaktır. Neoplastik ve non-neoplastik, konjenital ve kazanılmış deri lezyonlarının yanısıra herediter ve non-herediter deri lezyonlarını da belirtirken nevüs teriminin kullanımında güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu güçlükler dikkate alınarak yazarlar; genetik mozaizmin yeni kategorisini tek bir kavram olarak bir araya getirmeyi amaçlamışlardır : *Nevüsler gözle görülebilir, sınırları belirli olan, mukozaya komşu olup genetik mozaizmi yansıtan uzun ömürlü deri lezyonlarıdır.* Melanositik nevüsler hariç diğer nevüsler neoplastik proliferasyon ve malign neoplazi göstermezler (4).

Melanositik nevüslerdeki morfolojik değişimler, malign transformasyona dönüşümün belirtisi olabilir. Ancak gebelik, puberte veya sistemik kortikosteroid tedavisi ya da güneşe maruz kalınma gibi lokal faktörlerin de morfolojik değişiklik nedeni olabileceği unutulmamalıdır. Fakat yine de nevüs morfolojisindeki ani değişimlerin (renk, yüzey veya büyüklük, ağrılı veya ağrısız olması, kaşıntı, ülserasyon veya kanama) birkaç gün veya haftada malign transformasyona dönüşebileceği unutulmamalıdır (5).

2.1.1 Melanositik nevüsün oluşumu :

Melanositik nevüs; epidermiste (junctional), dermiste (intradermal), veya her iki bölgede (compound) melanositlerin toplanması ile oluşur. Pigmentasyon, genellikle epidermal melanositlerin üst üste gelerek tabakalaşması ve pigment yüklü olmaları ile oluşmaktadır. Nevüs hücreli nevüs, nevusellüler nevüs, nevositik nevüs, yumuşak nevüs, nöronevüs,

pigmente nevüs, pigmente mol, melanositik nevüs, kıllı nevüs, hücreli nevüs ve benign melanositom olarak da adlandırılabilirler. Ancak benign melanom, melanositik nevüs tanımlamasında kullanılmamaktadır (5). Melanositik nevüslerin, nöral krestte defektif melanoblastlardan orijin alan benign neoplazmlar olduğu kabul edilmektedir. Genetik değişimler sonucu oluşan defektif melanoblastlar, normal melanoblastlarla birlikte dermise ve epidermin bazal tabakasına göç ederek, melanositlere farklılaşabilmektedir.

Memelilerde epidermis ve derminin altpopulasyonlarını oluşturan melanositler, melanin birikimi ile hücreye pigmentasyon sağlarlar. Organizmanın gelişim süresince deri (epidermal ve dermal bölge), göz (koroid ve iris stromasında) ve saç folikülleri olmak üzere üç temel bölgeye yerleşirler (6).

2.1.2 Melanositik nevüslerin histolojik görünüşleri :

Nevüs hücreleri, üç çeşit histolojik görünüme sahiptir :

- A tipi nevüs hücreleri (Epiteloid)
- B tipi nevüs hücreleri (Lenfoid)
- C tipi nevüs hücreleri (Fibrositik)

A tipi nevüs hücreleri, yüzeysel papiller dermiste bulunur. Büyük nükleuslu, bol pigmentli ve geniş sitoplazmalı hücrelerden oluşurlar. B tipi nevüsler ise orta dermiste bulunur. Bu hücreler, A tipi hücrelerinden küçük, dar sitoplazmalı, daha yuvarlak nükleusludur ve daha koyu boyanırlar. C tipi nevüs hücreleri, daha derin dermiste bulunup, iplik şeklinde görülen fibrillerin birikiminden oluşur. Bu fibriller, birbirinden ayrılabilirdiği gibi, izole de edilebilir. C tipi nevüs hücreleri, düz ve iğ şeklindedir. Bu nedenle schwann hücreleri ve fibroblastlardan ayrımları için S-100 boyası ve Miyelin Bazik Protein (MBP) içeren immünoperoksidaz boyaları kullanılması gerekebilir.

Bu nevüs tiplerinin hepsinde de melanositler, sinir organellerine ve schwann hücrelerine değişen derecelerde farklılaşabilmektedir. Nevüs içinde meydana gelen malignansiler; nörofibrosarkom, liposarkom, rabdomyosarkom veya bir nevüs hücresinden melanositten köken alan klasik bir melanom olabilmektedir (3,7).

2.1.3 Melanositik lezyonların sınıflandırılması :

Kaplan ve arkadaşları (3) tarafından oluşturulan sınıflandırma aşağıda verilmiştir :

A - Epidermal lezyonlar :

- Ephelis (Freckle)
- Lentigo
- Café au lait
- Junctional
- Lentigo maligna (Hutchinson Freckle)

B -Dermal Lezyonlar :

- Intradermal (Nevosellular)
- Deep dermal-dendritik (Blue nevüs, Mongolian spot, Sellular blue nevüs, Ota nevüs, Ito nevüs)
- Deep dermal-nöral
- Değişik varyantlar (Displastik nevüs, Spitz nevüs, Halo nevüs, Becker's nevüs, Recurrent nevüs)

Epidermis, üst dermis ve alt dermis nevüs içinde, yer yer doğal yapısına uygun şekilde bulunabilir. Ayrıca bu durum, her ne kadar doğum anında bulunup bulunmadığına bağlı olsa da bölge ve lokasyonuna da bağlıdır (3,8).

2.1.4 Bazı benign melanositik nevüsler :

Yukarıda sınıflandırma sisteminde belirtilen lezyonlardan, sadece araştırma kapsamına girenlere kısaca değinilecektir.

“Junctional nevüs”, vücudun herhangi bir yerinde bulunabilir. Avuç içi, ayak tabanı, genital bölge ve mukoz membranlardaki nevüsler “junctional” olabilir. Fakat pek çoğu “compound” nevüslerdir. Doğumdan sonra herhangi bir zamanda oluşabilir.

“Compound nevüs”, “junctional” ve intradermal elementlerdendir. Adölesan dönemde daha yaygın olarak gelişir. Saçlı olabilir, klinik olarak, sıklıkla intradermal nevüsle karıştırılabilir.

Intradermal nevüs, yetişkinlerde sıklıkla görülen olgun mollerdir. Genellikle benign dir ve pratikte hiçbir zaman malign özellik kazanmaz (8).

2.1.5 Malignansi riski taşıyan lezyonlar :

Malignansi riski taşıyan lezyonlarda büyüklük, lokasyon ve histolojik özellikler tanı için son derece önemlidir : **Büyüklük** : Konjenital bir nevüsün klinik tanımlanmasında büyüklük

çok önemlidir (9). NIH sınıflandırma sistemine göre; dev nevüsler 100 cm² den daha büyüktür. Büyük nevüs 10-100 cm² dir. Küçük nevüsler ise 10 cm² den küçüktür. **Yerleşim :** Vakalarda sırt, kalça ve arka kafa derisi üzerinde malignansi gelişme olasılığı çok yüksektir. Arka bölgelerde olgunlaşmamış embriyonik ve nöral nevüs hücreleri bulunma riski olması nedeniyle malignite daha fazladır. Dev lezyonların çoğu sırt ve kafa derisinde görülmektedir. Orta ve 10 cm'den daha küçük lezyonlar ön gövdede, ekstremitelerde ve yüzde daha sık görülmektedir. **Histoloji :** Nevüsler, pek çok histolojik özelliklere sahiptir. Bu özellikler; lokasyonla, oluşum yaşı ile, deri içinde nevüs hücrelerinin derinliği ile, embriyolojik gelişimin evresiyle ve fonksiyonel farklılaşma tipiyle ilişkilidir (3)

Total melanositik nevüs sayısı, saç rengi, meslek nedeniyle güneşe maruz kalma, deri tipi de, melanom oluşum riskini artıran önemli faktörlerdir (10).

2.1.5.1 Displastik nevüs (DN) :

Sitolojik atipi gösteren nevüs hücrelerinden oluşurlar. Kanser hücrelerinin yapısal özelliklerini gösterir fakat yavaş üreme eğilimindedirler. Bu lezyonlar, melanomun histogenetik öncülüdür ve melanom gelişim riski gösterdiğinden, bu bireyler için önemli bir markerdir (11,12).

2.1.5.1.1 Displastik nevüsün klinik ve histolojik ayrımı :

Displastik nevüsler, klinik olarak, 5-15 mm büyüklüğünde sonradan edinilen (acquired) nevüslerdir (13). Özellikle gövdede olmak üzere vücudun pek çok yerinde görülür. Ancak sonradan edinilen diğer nevüslere göre daha geç ortaya çıkarlar. Displastik nevüs, her ne kadar ailesel ise de, sporadik olarak da görülebilir. Sporadik formdaki displastik nevüslü hastaların melanoma dönüşüm riski % 5-10 iken, ailesel formunda % 100 olabilmektedir. Melanomlar, her ne kadar displastik nevüslerden geliyorsa da bu bölgeler dışında da, de novo melanomların görülmesi olasıdır. Bu yüzden displastik nevüsler, melanom öncülü olmalarının yanı sıra, malignansi riski artışının da belirtisidirler (3).

Atipik bir nevüs, eğer tüm özelliklerini gösteriyorsa sadece klinik ve histolojik olarak kolaylıkla tanımlanabilir (14). Ancak displastik nevüslerin sınıflandırmasında, sık görülen melanositik nevüslerden ayırdedilmesi için, gerek histolojik olarak gerekse immünohistokimyasal yöntemlerle elde edilebilecek bir bulgu olmadığından oldukça fazla güçlüklerle karşılaşmaktadır. Multipli displastik nevüslerde, melanom riski, sıklıkla görülen diğer tip nevüslere oranla daha fazladır ve daha erken yaşlarda ortaya çıkar. Bunun temel

nedeni bilinmemekte fakat kromozom instabilitesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Bu genetik değişimlerin karakterize edilmesi displastik nevüs'ün tanımlanmasında önemli bulgu sağlayacaktır. Bu nevüs tipinde genetik değişimler üzerine yapılan araştırmalar, displastik nevüslerin lokasyonlarını ve cinsiyet farklılıklarına göre gözlenen sıklıklarını belirlemeye yardımcı olacaktır. Sonuç olarak, moleküler genetikte tekniklerin hızla gelişmesi ve bu konuda yapılan yoğun araştırmalar, kısa sürede bu alanda edinilen bilgilerin gelişmesine olanak sağlayacaktır (14).

2.1.5.1.2 Displastik nevüste sitogenetik çalışmalar :

Melanom öncülü olan displastik nevüslerin maligniteye dönüşü (prelösemide gözleendiği gibi) sırasında bu lezyonlarda kromozom değişimler görölmektedir (15).

Benign compound nevüslerde % 18 (2 / 11) ve displastik nevüs örneklerinde % 40 oranında (2 / 5) *p53* mutasyonu saptanmıştır (16).

Displastik nevüs sendromu'nun (DNS) ailesel formu, sporadik formdan önce tanımlanmıştır. Ailesel vakalarda kalıtım muhtemelen otozomal dominant geçişlidir. Ailesel formundan sorumlu gen, 1 no'lu kromozom üzerinde haritalanmıştır (17). Sendromun ailesel ve sporadik formları arasındaki ilişki açık değildir fakat her iki formda da melanomdan başka diğer malign neoplazmlar görölebilmektedir. Ancak ailesel vakalarda; malign lenfoma, akciğer, meme ve pankreas karsinomu dışında diğer malign neoplazmlar görölebilirken, sporadik vakalarda testiküler teratomların frekansında artış gözlenmiştir (18).

Mc Donagh ve arkadaşları tarafından (18), DNS'lu yirmibir yaşında bir erkek hastada saptanan 11 p - (11.kromozomun kısa kolunda parça kaybı) kromozom anomalisinin, daha önceki yayınlarla ilişkisi saptanamamıştır. Bu durum da DNS'unun sadece ailesel değil sporadik olarak da oluştuğu ve bu aşamada genetik faktörlerin de önemli olabileceği hipotezini desteklemektedir (18).

DNS ve ailesel melanom oluşumuna neden olan genetik değişimleri belirlemek üzere son yıllarda çok çaba sarfedilmektedir. Çalışmaların çoğu, melanom hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir. Melanomda, multipli kromozomal değişimler, sıklıkla 1, 6, ve 7 no'lu kromozomlarda görölmektedir (2). Kath ve arkadaşları (20), tümör çoğalımı görölen melanositik lezyonların hücre hatlarında fazla miktarda sayısal ve yapısal değişim saptamışlardır. Weiss ve arkadaşları (14) çalışmalarında, yaygın olarak görölen nevüslerde belirgin bir kromozom değişimi görölmemesine karşın, oniki displastik nevüsün üçünde

değişiklik görmüş, melanomların hepsinde anormal karyotip belirlemişlerdir. Ancak bu anomalilerin hiç biri tümöre spesifik bulunmamıştır. Displastik nevüslü üç hücre hattında 10q24-26 delesyonu; pek çok melanom vakalarının yanısıra yirmialtı displastik nevüs hücre hattının dördünde de 9p delesyonu saptanmıştır.

Birçok araştırma grubu, DNS'de kromozom fragilitelerinin sıklıkla görüldüğünü belirlemiştir (2). Ancak bu fragilite, Fankoni anemisi, Ataxia telangiektasi, Bloom Sendromu gibi klasik kırılma sendromlarına benzerlik göstermemektedir. UV etkisiyle oluşmayan, ailesel melanomlu bireylerin hücrelerinde, melanomlu ve melanomsuz DNS hastalarının hücrelerinde de kromozomal fragilite belirlenmiştir. Bu bireylerde görülen kromozomal fragilite sadece melanositlerde değil, lenfosit ve fibroblastlarda da tayin edilmiştir (2).

UV-C ışınlarından etkilenen multipli displastik nevüslü hastaların hücrelerindeki SCE oranında, sporadik melanomlu hastalarla ya da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında artış olduğu saptanmıştır. DNS'li hastaların SCE oranı, bireylere göre farklılık göstermektedir. Bu nedenle bu metodun sonucu gözönünde bulundurulmamıştır (20).

Kromozom fragilitelerinin genetik temeli tam olarak bilinmemektedir. Ancak bu fragilite, DNS / MM'li ailelerde pankreas karsinomunun görülme insidensinin yüksek oluşu ile kromozom instabilitesi arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (14).

2.1.5.2 Konjenital melanositik nevüs :

Konjenital melanositik nevüs, doğumda mevcut olup, epidermis ve dermiste melanositlerin birikimi sonucu oluşmuştur (13). Bu lezyonlar, yaşamın ilk yıllarından itibaren ara sıra da olsa soluk renkte göründükleri için doğumda farkedilememektedirler. Pigmentasyon, genellikle yaşamın ilk yılının sonlarına doğru görülebilmektedir. Bebeklerde, hiperpigmentasyonun pek çok nedenleri vardır. Hepsi melanosit proliferasyonu ile ilişkili değildir.

Mikroskopik olarak, konjenital nevüste melanositik proliferasyonun farklı patternleri gözlenebilir. Sadece histolojik özelliklere bakarak nevüsün konjenital olup olmadığını belirlemek her zaman mümkün değildir. Küçük nevüsler de konjenital olabilir ve doğumda mevcut oldukları konfirme edilerek histopatolojik inceleme ile tanınırlar. Geniş konjenital nevüsler, 1 / 60.000 doğumda meydana gelir. Küçük konjenital nevüsler ise (biyopsiyle konfirme edilebilir) 1 / 100 doğumda görülür.

Konjenital nevüsler, akral lentiginöz melanom öncülü olarak da tanımlanmaktadır (5).

2.1.5.2.1 Geniş (Dev) konjenital nevüs :

Konjenital nevüs, doğumda belirlenen herhangi bir nevüştür. Diğer konjenital özelliklere sahip olmasından ziyade; geniş büyüklükte, pek çok lezyonu olan dermatom dağılımlı bazen leptomeningeal melanositozla bağlantılı olma özelliklerine sahiptir. 10 cm den büyük konjenital nevüsler, 1 / 20.000 doğumda görülür.

Geniş “Dev” konjenital nevüsün tanımlanması, literatüre göre değişiklik göstermektedir. Genellikle çaplarının 5-20 cm arasında değiştiği hatta vücudun yüzeyini örten geniş alanlar kapladığı da ifade edilmektedir.

Lezyonlar, soluk kahverengi, koyu kahverengi veya siyah olabilmektedir. Konjenital nevüsler, vücut yüzeyinin herhangi bir yerinde meydana gelebilmektedir. Nevüs, düz (makular) veya zeminden yüksek, düzensiz yüzeyli olabilir. Zaman içinde büyüme gösterebilir ya da aynı büyüklüğü korur.

Arasıra nevüs içinde küçük nodüller görülebilir. Deri altı veya derin dermal dokuda bulunabilir. Dermisin daha yüzeysel kısmında yer alabilir. Nodüller genellikle benignedir ve sıklıkla nevüsün “neurotizasyonu” ile ilişkilidir. Bazı lezyonlar yaşla beraber koyulaşırken, diğerlerinin rengi açılabilir.

Konjenital nevüslerin malignansi riski, % 0 - 42 oranında değişim göstermektedir (3). Bergfeld ve arkadaşları (21), dev konjenital nevüslerde malignansi riskinin % 30 - 42 olduğunu saptamışlardır.

2.1.5.2.2 Küçük konjenital nevüsler :

100 doğumda bir görülen küçük konjenital nevüs, yaklaşık 1-3 cm çapındadır. Yüzeyden hafif yüksek, düzensiz pigmentli bir yüzeye sahiptir. Lezyon içinden artan miktarda kıl çıkabilir. Küçük konjenital nevüslerin ailesel olduğu durumlarda, malign melanom görülme insidensinde artış vardır (13).

Küçük lezyonlar, daha yüzeysel olup, farklı tanımlanabilir. Geniş konjenital nevüsler, tipik histolojik özelliklere sahip oldukları halde, küçük konjenital nevüsler, sonradan edinilmiş (acquired) nevüslerden her zaman kesin olarak ayırdedilemezler (3).

Küçük konjenital nevüsün malign melanomla bağlantısına yönelik yeterli kanıt bulunamamıştır. Rhodes ve arkadaşları (22) bu tip nevüslerde malignansi riskini % 5 olarak belirlemişlerdir. Illig ve arkadaşları (23) tarafından yapılan diğer bir çalışmada da 10 cm den küçük olan küçük konjenital nevüslerde malignansi riskinde artış olduğu belirtilmiştir.

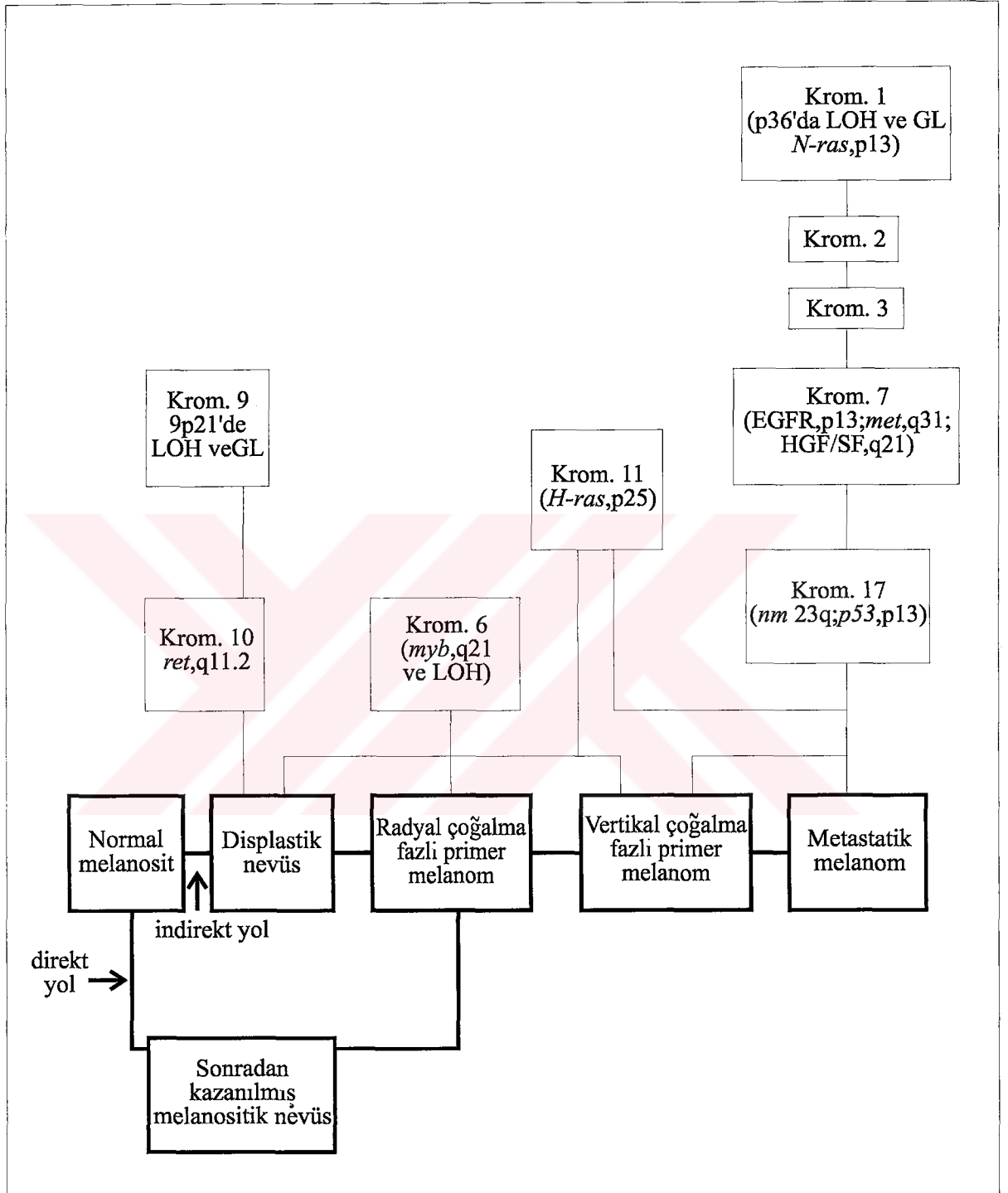
2.1.5.3 Sonradan edinilmiş (acquired) melanositik nevüs :

Sonradan edinilmiş nevüsler (Common acquired nevi); her yerde gözlenen lezyonlardır ve malign melanom histogenezinde rol oynadıklarına yönelik kesin bir bilgi yoktur (1). Bir yaşında görülmeye başlar ve yirmi yaşına kadar devam eder. Yaşamın ilk yıllarında görülen nevüsler, ışıkla ilişkilidir. Fakat çok sayıda bulunan nevüsler, melanom oluşumu için büyük ölçüde risk teşkil eder (1,5,11).

2.1.6 Melanositik sistemde neoplastik gelişimin evreleri (Tümör gelişimi) :

Normal hücrelerin metastatik kanser hücrelerine dönüşümünde geçen olaylar dizisi; tümör progresyonu (tümörün gelişimi) olarak kabul edilmektedir (Tablo 1). Melanom oluşumuna yönelik hipotetik çeşitli modeller oluşturulmuştur (24). İnsan epidermal melanositlerindeki tümör gelişimi; bir dizi tümör gelişimi basamaklarından oluşmaktadır (11,19,25-27).

Malign melanomda tümör gelişimi, indirekt ve direkt olmak üzere iki şekilde oluşabilmektedir. Şekil 1’de tümör gelişim aşamaları ve her basamakta hangi kromozomun ve genlerin rol oynayabileceği şematize edilmiştir (27). İndirekt tümör gelişimi, çok aşamalı bir yol olup daha sık görülür (19,25).



Şekil 1 : Melanositlerin metastatik melanoma dönüşümünde bir tümör gelişim modeli ile ilgili kromozom bölgeleri ve genleri (LOH: Heterozigosite kaybı; GL: Genetik linkaj) (27)

Melanomun sık rastlanılan dört yaygın biyolojik formundan üçü, indirekt tümör gelişim yoluyla metastaz yapma özelliğine sahiptir : En çok yüzeysel dağılım gösteren melanom görülmekte olup, indirekt tümör gelişim modeline örnektir. Nodüler melanom ise, direkt tümör gelişimine örnektir. İndirekt tümör gelişiminin lezyonel aşamaları Tablo 1’ de gösterilmiştir :

Tablo 1 : İnsan melanosit sisteminde tümör gelişimi (19)

Aşama	Melanosit Lezyonu
1	Sonradan edinilmiş melanositik nevüs (yapısal veya sitolojik atipi yok)
2	Sürekli yapısal atipili melanositik nevüs (anormal farklılaşma)
3	Sürekli yapısal atipili ve sitolojik atipili displastik nevüs
4	Radyal çoğalma fazlı primer melanom (metastaz özelliği yok)
5	Vertikal çoğalma fazlı primer melanom (metastaz özelliği var)
6	Metastatik melanom

2.1.7 Malign melanomun sınıflandırılması :

Malign melanomlar, genetik özellikleri değişikliğe uğramış olan melanositik lezyonlardan oluşmaktadır. Bu oluşum, Tablo 1’de özetlendiği gibi bazı aşamalardan geçerek gerçekleşmektedir. Doku, malign özellik kazandıktan sonra, büyüme profili; dermise radyal veya vertikal olarak gelişim göstermektedir. Malign özellik gösteren hücreler, dermise paralel çoğalmı gösteriyorsa Radyal Çoğalma Fazlı (RGP= Radial Growth Phase), vertikal çoğalmı gösteriyorsa Vertikal Çoğalma Fazlı (VGP= Vertical Growth Phase) malign melanom olarak isimlendirilirler. VGP malign melanomun metastaz oluşturma özelliği vardır. Dolayısıyla VGP, metastatik melanom oluşumuna öncülük etmektedir.

Yukarıda sonradan edinilmiş nevüs ve diğer malignansi riski taşıyan lezyonlar incelendiği için burada sadece RGP ve VGP malign melanomlara ve metastatik melanoma değinilecektir.

2.1.7.1 Radyal Çoğalma Fazlı (RGP = Radial Growth Phase) malign melanom :

Radyal çoğalma fazlı primer melanom, ilk malign basamağı oluşturmaktadır. Kendiliğinden çoğalma ve lokal invazyon için kompetans geliştirirler. Metastatik dağılım özelliği göstermezler (11).

2.1.7.2 Vertikal oğalma Fazlı (VGP = Vertical Growth Phase) malign melanom :

Bu hücrelerin morfolojileri, farklı hücre hatlarında bipolar melanositik hücrelerden epiteloid hücrelere kadar değişiklik gösterir. Hücrelerin % 20 si pigmentlidir. Yumuşak agarda çok iyi üreme gösterir ve nude farelere enjekte edildiğinde tümör oluşumuna neden olur. Normal melanositlerle karşılaştırıldığında, Vertikal oğalma Fazlı (VGP) primer melanom hücrelerinin, eksojen büyüme faktörü gereksinimlerinin azalmış olduğu görülür. Forbol esterleriyle veya bakteriyal toksinlerle intrasellular siklik AMP seviyelerindeki artışla oluşan protein kinaz C aktivasyonu; normal melanositlere veya nevüs hücrelerinde görülen etkiyle benzerlik göstermemektedir. VGP hücreleri, serumsuz ortamda sürekli ürerler. Büyüme faktörleri ilave edildiğinde büyüme hızı büyük ölçüde artmaktadır. Sadece insülinin proliferasyon için gerekli olduğu gözlenmiştir (25).

Bu lezyonlar, RGP'ın bir odağı olarak farklı bir patternde ve yapısal olarak farklı üreyen hücrelerin yeni bir popülasyonu olarak ortaya çıkmaktadır (11).

2.1.7.3 Metastatik malign melanom :

Metastatik hücreler, melanomda tümör gelişiminin en son lezyonel aşamasıdır. Doku kültüründe en sık görülen örnekler; lenf nodu metastazları ile deriye ait nodüllerden oluşmaktadır. Bu hücrelerden, hücre hattı oluşturmada başarı oranı % 70 tir. Metastatik hücrelerin morfolojisi genel olarak VGP hücrelerinden farklı değildir. Metastatik melanom hücreleri, VGP primer melanom hücreleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek densitede üreme özelliği kazanmışlardır. Daha kısa doubling time'a sahiptir, timusu çıkarılmış farede hızlı üreme gösterir. Eksojen büyüme faktörüne daha az bağımlıdır (25).

Melanomdaki metastaz, diğer neoplastik sistemdeki metastaz biyolojisine benzer. Yüzeyel dağılımlı malign melanomun % 40-50'sinde tümör metastazı, epidermal lezyon sonrası gelişir. Gelişimin büyümesi bağımsızdır (11).

Histopatolojik ve prognostik özellikleri dikkate alınarak tanımlanan malign melanomlar, klinikopatolojik özelliklerine göre; Lentigo malign melanom, Yüzeyel yayılan (Superficial spreading) melanom, Nodüler melanom, Akral lentiginöz melanom olarak sınıflandırılmıştır (1,8).

2.1.8 Hücre kültürü çalışmaları :

Vücut yüzeyinde lokalize melanosit lezyonların, hücre kültüründe kolay çoğalması; klinik ve histopatolojik çalışmalara olanak sağlamaktadır. Doku kültürü tekniklerindeki gelişmeler, lezyonlardan ve normal deriden izole edilen melanositlerin genetik, biyolojik ve immünolojik özelliklerini belirleme imkanını vermektedir (11).

Normal deriden ve benign pigmentli lezyonlardan melanosit elde edilimine yönelik in vitro çalışmalar ancak 1987 yıllarından itibaren mümkün olmuştur. Normal veya lezyonel deriden melanosit izolasyonu için, tripsin, kollajenaz, hyaluronidaz veya dispaz gibi proteolitik enzimlerle muamele etmek gerekir. Tripsin genellikle epidermisi dermisten ayırtmak için kullanılmaktadır. Melanositleri keratinositlerden, fibroblastlardan, endotelial hücrelerden ve diğer yapısal komponentlerden ayırmak için diğer enzimlerin kombinasyonu kullanılmaktadır. Melanosit kültürlerinden keratinosit ve fibroblastları elimine etmek dışında, kompleks pigmentli lezyonlardan kültür hazırlamak ve çalışma yapmak üzere yöntemler geliştirilmiştir (11,19)

2.1.8.1 Melanositlerin in vitro özellikleri :

Melanositik nevüsler, melanom hücrelerinden ve deri melanositlerden farklı olarak yumuşak agarda koloni oluşturmada bağımsız olarak ürerler. Kısa süreli kültürde, melanomla ilişkili antiijenleri (Melanoma - associated antigens) eksprese ederler (Sinir büyüme faktörü reseptörü, transferrin-ilişkili p97, proteoglikan ve HLA-DR). Ancak uzun süreli kültürlerde bu antiijenlerin ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (28). Timusu çıkartılmış farelerde deri-altı enjeksiyon sonrası tümör oluşumunu meydana getirmezler. Kültürde nevüs dermal melanositleri, epidermal melanositlerden daha yüksek başarı oranına sahiptir. Melanositlerin proliferasyonu genellikle 3 - 5 ay sonra yavaşlar fakat bazı kültürler, özellikle konjenital nevüsler 1 -2 yıl kadar üremeye devam ederler.

Melanom hücreleri, yumuşak agarda kolaylıkla koloni oluşturabilirler. Primer melanom hücreleri, metastatik hücrelerle karşılaştırıldığında % 8'inin koloni oluşturma etkisi gösterdiği saptanmıştır (5,19,25).

Melanositik nevüslerin çoğu ve primer melanom hücreleri; neonatal melanositlere benzeyen, zayıf ince uzun ve hemen serpilen hücrelerdir. Ancak konjenital nevüsler, diğer melanositlerden daha geniştir ve epiteloid melanositlere benzerler.

Nevüsler ve primer melanom hücreleri, büyük ölçüde pigmentlidir. Primer kültür 1 - 2 hafta içinde düz ve geniş görünümlü fibroblastlar içerir. Nevüs ve primer melanom kültürleri, normal hücrelerden farklı görünürler. İki veya daha fazla nükleuslu hücrelerdir (29).

Hücre kültüründe, sonradan edinilmiş nevüsler ve konjenital nevüslerden elde edilen melanositlerin; epidermal melanositlere benzer büyüme faktörü gereksinimleri vardır. Fakat melanositler, fibroblast çoğalma faktörüne (FGF) daha az gereksinim duyarlar. Hem melanositler, hem de epidermal melanositler; bipolar, tripolar morfoloji gösterirler. Primer melanom hücrelerinin, yaklaşık olarak % 40-60'ı iğ şeklinde (diğerleri poligonal görünümündedir) görülmektedir. İleri VGP ve metastatik melanom hücreleri, epidermal melanosit ve melanositlerden daha yüksek densitede ürerler (5).

Kültür edilen insan melanositlerinin büyüme faktörü gereksinimleri, malign transformasyonun evresine bağlı olarak değişebilmektedir. Kültürdeki insan yenidoğan melanositlerinin proliferasyonunu; TPA (12-O-tetradekanoil-forbol-13-asetat), IBMX (İsobutilmetil ksantin), CT (Kolera toksini) gibi maddeler stimüle etmektedir. Yenidoğan melanositleri altı ay süresince en az 50 populasyon bölünürlüğünü korurken, yetişkinlerin derisinden elde edilen melanositler kültürde sadece bir ay korunabilmektedir. Primer melanomdan elde edilen melanositler de mitojene gerek duyarlar fakat proliferasyon oranı düşüktür. Metastatik melanositler; TPA, IBMX ve CT gibi faktörlere gerek duymadan proliferere olurlarken; konjenital ve displastik nevüsler, bu faktörler olmadan üreyemezler (28).

2.1.9 Melanositik hiperplazilerde biomarkerler :

Biyomarkerler, melanositik tümörlerin rutin mikroskopik görüntülerini değerlendirmek üzere kullanılmaktadır.

Tirozinaz etkisiyle dopa ve tirozin oksidasyonu, melanositik tümör markeri olarak kullanılabilir (30). Çeşitli melanositik tümörlerin farklılaşmasını tayin etmede östrojen ve progesteron bağlanma ile tayin etmek ve bunu monoklonal antikorlarla konfirme etmek mümkündür (31).

Benign nevüslerde, flow sitometriden yararlanarak, nüklear DNA içeriği, normal granulosit standardıyla karşılaştırılabilir. Bu yöntemle, benign nevüslerin % 34 ünde anöploid, primer melanom vakalarının % 85 inde hiperdiploidi gösterilmiştir (32).

S100 proteini, öküz beyninden izole edilmiş bir maddedir. Benign ve malign dokularda bulunabilmektedir. Normal epidermal melanositlerin, melanositik nevüslerin, primer ve

metastatik melanom hücrelerinin sitoplazmasında tayin edilebilir. HMB-45 monoklonal antikoru, pek çok melanomu tanır. Malign melanom, nevüs ve deri melanositlerinin ayırımında güvenli değildir. Melanom, karsinom ve lenfomanın ayırıcı tanısında sıklıkla kullanılmaktadır.

γ -immün protein (γ -IP10) denilen sitokin, benign melanositik proliferasyon sonucu oluşan farklılaşmayı tanımlamada kullanılmaktadır. Melanositik orjinli tümörlerin tanımlanmasında diğer markerlerden de yararlanılabilir. Heat-stable antigen varlığı ve NKIC3 monoklonal antikor pozitifliği, diğer markerlerden bazılarıdır. Bu markerler, nevüs hücrelerini ve malign melanositleri tanır fakat normal melanositleri tanımazlar (5).

Son zamanlarda, malign melanomu diyagnostik ve prognostik açıdan tanımlayabilmek için İntegrinler, CD44, plazminojen aktivasyon sisteminden yararlanılmasının yanısıra, PCR yönteminden yararlanarak dolaşım sisteminde mikrometastaz tayini de geliştirilmiştir (33).

2.1.10 Malign melanomun klinik özellikleri ve erken tanının önemi :

Malign melanom klinik tanısında; renk değişimi, büyüklük değişimi, biçim değişimi, yüzeyel değişim, deri etrafında değişim, hassasiyette değişim, yoğunlukta ve koyulukta değişim, dikkat edilecek belirgin özelliklerdir.

Erken tanı için deri incelemesinin hem hekim tarafından hem de hastanın kendisi tarafından yapılması gereklidir. Çünkü 0.76 mm den daha az derinlikteki lezyonlarda değişimler belirlenirse; primer tümörün cerrahi olarak alınması ile hasta % 100 e yakın bir oranla tedavi edilmiş olmaktadır (34).

Malign melanom tanısı sadece klinik görünümün izlenmesi ile değil, hikaye ve semptomlarla da ilgilidir. Önceden bulunan melanositik nevüs veya yeni pigmentli lezyonun gelişimindeki değişim; özellikle 40 yaşından sonra, MM olasılığını değerlendirmek açısından hekimler için önem teşkil etmektedir (13).

Özetle, hastanın ve hekimin deri lezyonlarını rutin olarak incelemesi; erken MM tanısı koymada büyük fayda sağlamaktadır. Ayrıca küçük kuşkulu lezyonların alınması; deri kanseri oluşumu nedeniyle sonuçlanan mortaliteyi azaltmak bakımından son derece önemlidir.

2.1.11 Melanositik lezyonların gelişiminde onkogenler ve tümör supresör genler :

Protoonkogenler, hücrelerin ya da dokuların çoğalma ve farklılaşmasında önemli düzenleyicilerdir. Ekspresyonlarındaki veya gen ürünlerindeki değişiklik; malign potansiyel

göstermemektedir. Son yıllarda daha çok *ras* ve *myc* ailesiyle çalışılmak üzere 40'dan fazla spesifik onkogenle çalışma yapılmıştır (35,36) Bazı displastik nevüslü bireylerde *ras* değişimlerine rastlanmıştır. Melanom hücre hattının % 25'inde ve melanom dokularının % 5-6 sında bu onkogenin aktivasyonu gösterilmiştir (37).

Melanom gelişiminde retinoblastoma geninin (*rb*) rolüne yönelik yapılan araştırmalarda; melanomun, ailesel retinoblastomlu hastalarda yaygın görülen sekonder bir tümör olarak oluştuğu saptanmıştır (38). Ancak retinoblastom hücre hattında yapılan araştırmalar, *rb* geni veya ürününün (p110 RB) değişimini göstermek için yeterli görülmemiştir. *p53*, Wilm's geni ve *NF-1* gibi diğer tümör supresör genlerinin de melanom gelişiminde rolü olduğu henüz belirlenmemiştir. Klinik bulgular da bu genlerin melanom gelişimi ile ilişkili olmadığını desteklemektedir.

Tümör supresör genler kalıtilabilir tümörlerdeki kayıplarıyla tanımlanmaktadır. Melanom ve melanom hücre hatlarında, heterozigosite kaybını (LOH) belirlemek üzere çeşitli DNA problemleriyle çalışmalar yapılmış fakat spesifik bir pattern belirlenememiştir (39). Dracopoli ve arkadaşları (40), LOH için 1p36 lokusunu çalışmış; bu bölgenin; DNS / MM hastalarda melanoma riski bağlantılı olduğunu saptamışlardır. Genlerin kaybı, sadece geç melanom evresinde tayin edilmiştir. 1p36 lokalizasyonu, tümör gelişimine neden olan bir supresör gen barındırdığını düşündürmektedir. Trent ve arkadaşları (41), melanom hücre hatlarında 6 nolu kromozomun transfeksiyon sonrası tümörjenisite özelliklerinin kaybolduğunu bu kromozom üzerinde tümör supresör gen bulunduğunu ifade etmektedirler. Ancak yine de melanoma geçiş sürecini başlatan genin, nerede lokalize olduğu bilinmemektedir (14,42,43).

2.1.12 Nevüslerde ve malign melanomda sitogenetik çalışmalar :

Melanom primer kültürlerinden ve hücre hattından kromozom analizine yönelik çalışmalara sıklıkla rastlanmasına karşın, melanositik nevüs kültürlerinden yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. İn vitro koşullarda melanositik hücrelerin çoğaltılması, spesifik ortamların kullanımını gerektirmektedir. Son zamanlarda bu çalışma için Sigma MMK-2 gibi ticari özel ortamlar geliştirilmiştir. Bu ortam, melanositik hücrelerin proliferasyonu için daha önce açıklanmış olan gerekli çoğalma faktörlerini ve mitojenleri içermektedir.

Richmond ve arkadaşları (26), melanositik nevüs kültüründen yapılan kromozom analizi sonucunda sekiz örneğin dördünde sitogenetik anomali saptamışlardır.

Cowan ve arkadaşları (15), biri nevüs diğeri iki displastik nevüsü olan vakadan alınan yirmialtı nevüsün dördünde kromozomal anomali olduğunu, spesifik olmasa da, iki nevüste monozomi 9 olduğunu belirlediler.

Thompson ve arkadaşları (44), onbir melanomun altısında near diploidi, ikisinde pseudotriploidi, üçünde pseudotetraploidi saptadılar. Metastatik melanomun birkaçında normal ve anormal karyotipi bir arada gözlemlemişlerdir. Hücre tipleri benzer olduğu için, normal olan hücrelerin melanositler mi yoksa kontamine olan fibroblastlar mı olduğu kesin belirlenememiştir.

Cowan ve arkadaşları (15), primer melanomlu bir vakada der (5) ve t (5;15) (p12;p12) translokasyonu, 7p13-7p22 inversiyonlu tandem duplikasyonu, der (11), der (17), der (20) ve 9p22 - pter (her iki kromozomun distal kısa kollarında delesyon) saptadılar. Bir vakanın üç metastatik melanom lezyonunda, hücrelerin hepsinde dic (1;4) ve del (6) markerleri gözlediler. Ayrıca çalışılan diğer vakalarda da çeşitli sayısal ve yapısal kromozom anomalilerine rastlamışlardır.

RGP malign melanom primer kültürlerinden elde edilen kromozom analizlerinde; hem klonal ya da sporadik 1 ve 6 no'lu kromozomla ilgili aberasyon belirlenmiştir, hem de diploid veya pseudodiploid karyotipler görülmüştür (25).

Melanositik hücrelerin tümör gelişim basamaklarında, anöploid sonuçlar gözlenmiştir. Sonradan edinilmiş nevüs veya konjenital nevüslerde sitogenetik anomali gözlenmemiştir. Ancak raslantısal anomaliler saptanmıştır. Oniki displastik nevüsün üçünde kromozomal değişimler saptanmıştır. RGP primer melanom hücre hattında pseudodiploid karyotiple t (6;22) translokasyonu saptanmıştır. VGP primer ve metastatik melanomlarda ise 1, 6, 7 no'lu kromozomlarda spesifik anomaliler saptanmıştır (11).

2.2 Mikrosatellit instabilitesi :

Mikrosatellit DNA ailesi; genom boyunca dağılmış 1 - 4 bp'lik basit ardarda tekrarlar (tandem repeat) şeklindeki dizileri kapsar. Mononükleotid tekrarlar çoğunlukla Adenin (A) ve Timin (T) tekrarlarından oluşmaktadır, Guanin (G) ve Sitozin (C) çok daha nadir görülmektedir. Dinükleotid tekrarlarda CA tekrarları, nisbeten sıktır ve genomun % 0.5'ini teşkil eder. 12'den daha uzun tekrarlar büyük ölçüde polimorfik özelliktedir. CT / AG tekrarları da sık görülür, yaklaşık her 50 kb da bir meydana gelir ve genomun % 0.2 'sini teşkil eder. CG / GC tekrarlarının daha nadir görülmesinin nedeni, bu dizilerdeki C'lerin metilasyon

ve deaminasyon sonucu T'e dönüşme olasılığının fazla olmasıdır (CpG gibi). Trinükleotid ve tetranükleotid tekrarları da büyük ölçüde polimorfiktir. Mikrosatellit tekrar bölgeleri, polimorfizm belirlenmesi yolu ile akrabalık testi olarak, çeşitli hastalıklarla ilişkisi yönünden ve genom haritalanması amaçları ile kullanılmaktadırlar.

Mikrosatellit DNA'nın önemi bilinmemektedir. CA / TG dinükleotid çiftinin ardarda tekrarları gibi alternatif pürin - pirimidin tekrarları, değişen DNA konformasyonları (Z DNA) gösterebilir (In vivo kanıtlanmamıştır). Mikrosatellit DNA'sı genel olarak intergenik (genler arası) DNA'da veya genlerin intronlarında tanımlanmıştır (45).

Mikrosatellit instabilitesi terimi, replikasyon hataları sonucu (RER - replication errors), mikrosatellit bölgelerde oluşan değişiklikleri tanımlar (46).

Mikrosatellitler, genetik açıdan stabil değildirler ve polimorfizm gösterirler. Ancak "Mikrosatellit İnstabilite" (MI, MIN) terimi genellikle bazı herediter ve sporadik kanserler için belirli tipte genomik instabiliteyi tanımlamaktadır. Bu tekrarların, doğal instabilitesi ile mikrosatellit mutator fenotipli kanserlerdeki instabilite arasındaki farkı belirlemek her zaman çok kolay olmaz (47). 20 - 24 Nisan 1996'da Washington'da düzenlenmiş olan AACR (American Association for Cancer Research) toplantısında, mikrosatellit instabilitesinin tanımında karşılaşılan güçlükler üzerinde durulmuştur. İlk tanımlamada, basit tekrarlayan dizileri belirlemek üzere "Ubiquitous Somatic Mutation" (USM) (Genomun her yerinde görülebilen somatik mutasyon) terimi kullanıldı. Bu tanım genom boyunca tekrarlayan instabiliteyi belirlemek bakımından daha anlamlı olmasına karşın, muhtemelen sadeliği nedeni ile MIN terimi daha sıklıkla kullanılmaktadır.

Tümör, tek bir hücrenin klonal çoğalımı ile gelişmektedir. Tümörlerde MIN görülmesi, mutlaka mutator bir fenotipin göstergesi değildir, doğal polimorfizmin sonucu olabilir. Tümör etiyojisi açısından doğal polimorfizmin bir önemi olmadığı belirtilmektedir. Görülen MIN, instabilitenin (Mutator Fenotip) ve klonalitenin (polimorfizm) belirtisi olabilir. Bu nedenle, tümörde, birden fazla mikrosatellit bölgede instabilite belirlenmesi ve bunun yanı sıra, bazı tümör genlerinde (onkogen / tümör supresör gen) de mutasyon saptanması, mutator fenotip ve mikrosatellit instabilitesini kanıtlamak için gereklidir (47).

HNPCC (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) gibi ailesel kanserlerde mikrosatellit bölgelerde değişim ve bunun MMR (Mismatch Repair) genlerindeki germ-hattı mutasyonlara bağlı olduğunun gösterilmesi sonucunda, daha erken yaşlarda ortaya çıkan ailesel

kanserler için yeni bir kanserleşme mekanizması tanımlanmıştır. Bu nedenle, ailesel kanserlerin MIN açısından araştırılması önem kazanmıştır (48).

2.2.1 Mikrosatellit instabilitesi ile ilgili ilk çalışmalar :

1992 yılında Perucho ve arkadaşları, genomik fingerprinting yaklaşımından yararlanarak AP - PCR (Arbitrarily Primed - Polymerase Chain Reaction) ile kolorektal tümörlerde kantitatif genetik değişiklikleri (allelık kayıp ve fazlalıkları) ve kolorektal tümörlerde mutasyonları belirlediler. USM (Ubiquitous Somatic Mutation) olarak tanımlanan bu mutasyonların genom boyunca yayılmış Alu tekrarlarının poli-A dizileri içindeki birkaç nükleotidin delesyonu sonucu oluştuğunu belirlediler. AP-PCR fingerprinting tekniğinin özelliği nedeni ile genomda binlerce somatik mutasyonun varlığı görülebildi. Bu çalışmanın ardından Ionov ve arkadaşları (49), kolorektal kanserlerde poli (dA, dT) dizilerinde somatik delesyonlar gösterdiler. Bu tümörlerde, 100.000 veya daha fazla benzer tipte mutasyon taşınabileceğini belirttiler ve bu değişikliklerin aynı hastada görülen farklı neoplastik odaklarda da bulunduğunu söylediler. Aynı hastada, aynı anda en az dört farklı tümöre rastlanması, tümörleşmede mutator mutasyonların önemli rol oynadığını göstermektedir. Ionov ve arkadaşları, çalıştıkları hastalarda MIN ile *p53* mutasyonu arasında ters bir ilişki belirlemişler ve bu genin, mutator mutasyonun hedefi olmadığını belirtmişlerdir. Bu tümörlerin biyolojik ve klinik özellikleri temel alınarak; kolon kanseri gelişimi için mikrosatellit bölgelerdeki değişimlerin yeni bir mutator mekanizmayı yansıttığına karar verildi. Kolorektal kanserlerde USM görülen tümörlerin daha iyi diferansiye tümörler oldukları ve prognozun daha iyi olduğu belirtildi.

Thibodeau ve arkadaşları (50) 1992'de HNPCC'de tümör supresör gen lokusunda allelik kayıpları saptama amacı ile PCR ile amplifikasyonu çalışmaları sırasında tekrar bölgelerindeki heterojen değişiklikleri saptadılar. 1993'ün başlarında kolon kanserlerinde proksimal kolona lokalizasyon ve hastanın yaşam süresinin artışıyla mikrosatellit instabilitesi (MIN) arasında pozitif korelasyon saptadılar. Ayrıca 5q, 17p ve 18q kromozomlarında saptanan LOH ile de ters bir korelasyon olduğunu buldular. Bu grup, HNPCC'de tümörlerin proksimal kolonda predominant olarak bulunduğunu gösterdiler Ancak MIN ve HNPCC arasında bir ilişki olduğunu kanıtlayamadılar (48).

Shibata ve arkadaşları (51) çok hassas bir metot olan SURF (Selektif Ultraviyole Radyasyon Fraksiyonasyon) tekniğinden yararlanarak kolonda adenom ve hemen yanındaki karsinomda mikrosatellit mutasyonlarını analiz ettiler. Adenom bölgesinde mikrosatellit

instabilitesinin karsinoma oranla daha fazla olduğunu saptadılar. Bu sonuç, kolon karsinomunun, selektif klonal yayılma (clonal expansion) yoluyla adenomdan geliştiği görüşünü desteklemektedir (47).

Klonal hücre popülasyonlarının, kullanılan çeşitli yöntemlerle yakalanabilmesi, kanserin saptanması ile eş anlamlıdır. Çok kısıtlı hücre sayısı ile dahi bu saptamayı mümkün kılan amplifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler, kanserin erken tanısında ümit verici gelişmelerdir (52).

Bakteri ve mayada DNA tamir mekanizmasını çalışan araştırmacılar, insan mikrosatellit instabilitelerinin paterni ile, bakteri ve mayalardaki mismatch tamir geni mutasyonlarının sonuçları arasında benzerliğe dikkat çektiler. Kısa süre sonra, bakteri ve mayada tanımlanan mismatch tamir genlerinin insandaki benzerleri de tanımlandı. Bu genler; hMSH2, hMLH1, hPMS1 ve hPMS2'dir (53). Takip eden çalışmalarda, mismatch tamir genlerinde meydana gelen mutasyonun, mikrosatellit instabilite gelişiminde rol oynayabileceği anlaşılmış ve bu genler insan genomunda klonlanarak tanımlanmış ve lokalize edilmişlerdir (54-56). Ancak, yüksek oranda mikrosatellit instabilite saptanan bazı vakalarda tamir geni mutasyonlarının görülmeyişi, ilgili başka genlerin de bulunabileceğini göstermektedir (57). Karsinogenezin ilk basamağında, genomik instabiliteye neden olan mutator fenotipin bulunduğu düşünülmektedir. Bu varsayım, birkaç araştırmacı grubunun sporadik kolorektal ve HNPCC kanserli geniş ailelerde yapmış oldukları çalışmaların sonucunda ortaya çıkmıştır. Son yıllarda araştırmacılar, HNPCC vakalarında 2 no'lu kromozomun kısa kolunda lokalize olan mismatch DNA tamir geninde (hMSH-2- bakteri ve mayadaki mutS geninin insandaki homoloğu) germ-hattı defekti belirlediler. Mismatch tamir genindeki bozukluklar, genomik lokusun her yerinde genetik hata artışına neden olarak, mutator fenotipi oluştururlar. İnsanda ikinci DNA tamir geni 3p üzerinde lokalize olup hMLH-1 adlandırılmıştır. Ayrıca hPMS1 ve hPMS2 olmak üzere iki ilave gen de bulunmuştur (54,58,59). Johnston ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (60). HNPCC'li hastada % 80-85 oranında mutator fenotip (MIN) belirlenmiştir. Bu fenotipin, MSH-2 ve MLH-1'deki germ-hattı mutasyonlarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Sporadik kolorektal kanserlerde ise RER pozitiflik frekansı % 12 - 28 oranında bulunmuştur. HNPCC vakalarında MSH-2 ve MLH-1 DNA tamir genlerinde somatik mutasyon görülme sıklığının % 50 oranında bulunması, MIN oluşumunda bu hMSH2 ve hMLH1'den başka bazı genlerin etkili olabileceğini göstermektedir (57,60).

Aaltonen ve arkadaşları (61), *K-ras*, *p53* ve *APC* (Adenomatöz polipozis koli) genlerinde mutasyon olasılığının HNPCC ve sporadik kolon kanserlerinde aynı olduğunu, buna karşılık ailesel karakterli HNPCC'de daha yaygın MIN gözlemlendiğini belirlediler ve RER ile HNPCC ilişkisini kurdular. Perucho (47) ve Thibodeau gruplarının (50) çalışmaları da RER ile USM'lerin yeni bir kanser mekanizmasını oluşturduklarını belirtmişlerdir. HNPCC'li hastalarda; gerek sporadik gerekse ailesel olarak genomik instabilitenin, mismatch tamir genlerindeki mutasyondan kaynaklandığı gösterilmiştir (62).

2.2.2 Mikrosatellit instabilite markerlerinin kullanımı :

Mikrosatellit markerleri, linkaj analizi ve primer gen haritalamada kullanılmaktadır. Spesifik bölgeler amplifiye edilerek, LOH belirlenmesi ve tümör supresör gen (TSG) haritalamasında kullanılabilmektedir. Bu analiz, bazı kalıtılan hastalıklardaki (Huntington, frajil X sendromu, miyotonik distrofi, spinocerebellar ataksi tip I, gibi) spesifik mutasyonların tanımlanmasında kullanılmaktadır (62,63).

İlk önce kolorektal kanserlerde (49,50,64) sonra diğer tümör tiplerinde (65-67) saptanan mikrosatellit instabilitesi, neoplastik dokularda mikrosatellit bölge delesyonu veya uzaması ile gösterilmiştir.

2.2.3 Mikrosatellit instabilitesi ve tümörigenez :

Tümörigenez, somatik mutasyon ve klonal genişleme (ekspansiyon) sonucu ortaya çıkan çok aşamalı bir mekanizmadır. Kanserde mutasyona uğrayan pek çok lokus tanımlanmış olmasına rağmen, tümörigenezin temposu hakkında yeterli bilgi edinilememiştir. Tümörün "doubling time" ve yaşının belirlenmesinde mikrosatellit allellerinin belirlenmesi yolu ile moleküler yaklaşım yöntemi geliştirilmiştir (51). Her ne kadar mikrosatellit instabilitesi ile belirlenen mutator fenotipin kanserin nedenlerinden biri olduğu anlaşılıyorsa da germ-hattı mismatch tamir geni defekti olup kanser geliştirmeyen bireylere rastlanmaktadır (57).

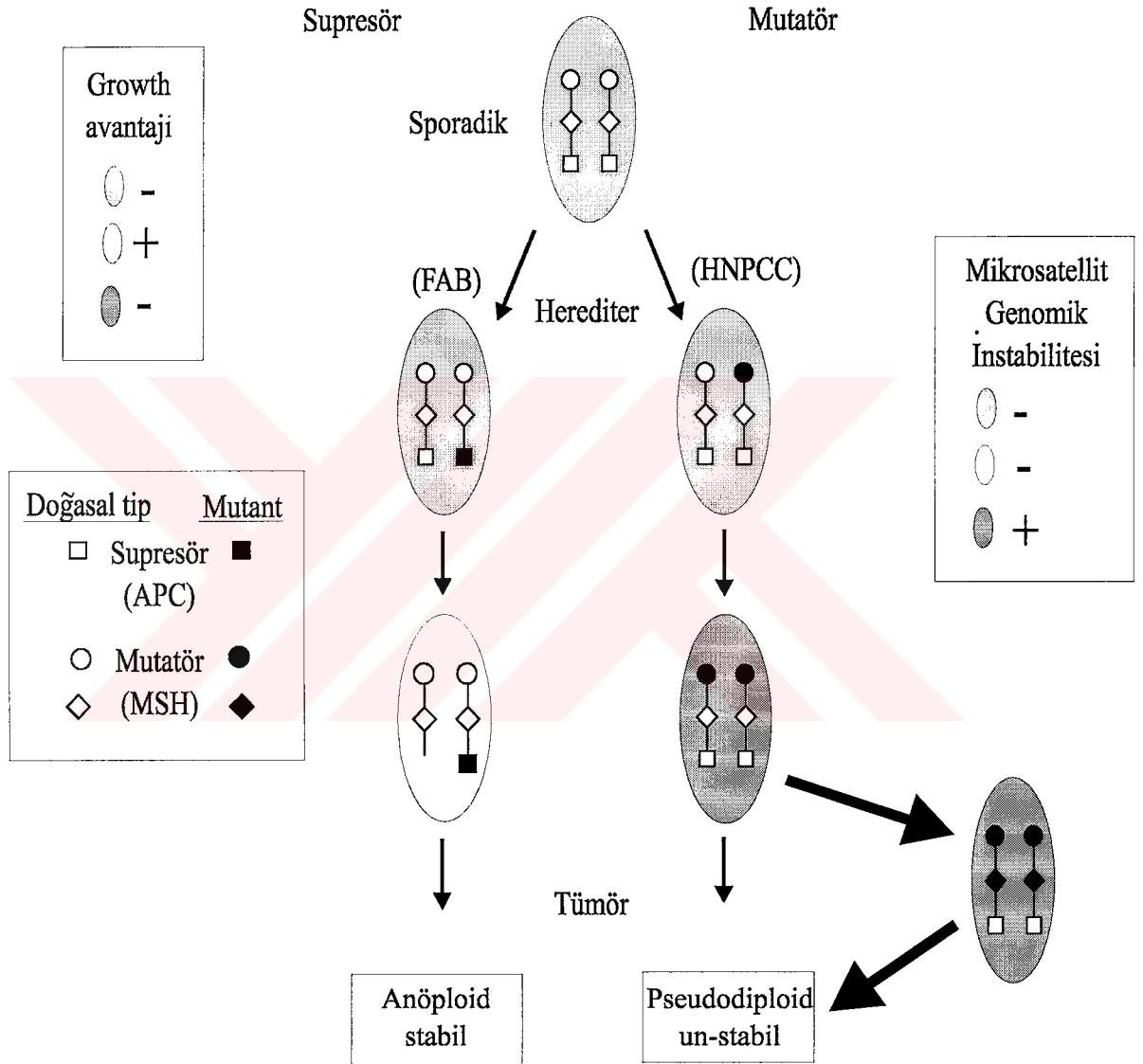
MMR genlerinden meydana gelen homozigot inaktivasyon (biri germ-line), hedef bir çok gende mutasyon olasılığının artmasına neden olmaktadır. Diğer MMR genleri de hedef genler arasındadır. Çünkü bu genler, ilk mutator mutasyonların mutajenik işlevleri için hedef teşkil etmektedir. Bu ek mutator mutasyon, tümörün genomik instabilitesine katkıda bulunur.

Onkogeneizde tümör supresör gen inaktivasyon modeli ve mutator mutasyon modeli şekil 2 'de karşılaştırılmaktadır. Şekil 2'de, kalıtsal sendromlar olarak FAP, HNPCC ve ilgili

defektif genler olarak APC, hMSH2, hMSH3, kolorektal kanser örneği için seçilmiştir. Aynı model başka kanserler için de geçerlidir. Tümör supresör yolda, hücrelerde tümör supresör genlerden ikisinde de mutasyon olması (ailesel kanserlerde biri germ-line aşamasında olmak üzere) ve hücrelerin seçici çoğalma avantajı kazanmaları gerekmektedir. Halbuki, mutator modelde, hücrenin başlangıçta çoğalma avantajı olmasına gerek yoktur, mutator fenotip nedeni ile aynı anda bir çok kanser geninde mutasyon gelişecektir (47).



ONKOGENEZDE GENETİK BASAMAKLAR



Şekil 2 : Onkogeneizde tümör supresör genler ve kademeli mutator yolları (47)

Tümörle ilgili mutasyonlar, kolorektal kanserlerde feçeste, mesane tumoründe hastaların idrarında ve orofarengeal kanserlerde rezeke edilmiş dokunun cerrahi marjinlerinde saptanarak, klinik açıdan tanıya katkı sağlanmaktadır. PCR yönteminin bulunmasından sonra, çok daha az miktarda DNA'dan tanıya gidebilmek mümkün olmuştur. Bu yöntemle, primer SCLC (Small Cell Lung Carcinoma) de kanda MIN ve LOH belirlenebilmiştir. Kanda MIN çalışmaları kanserin erken teşhisinde önemli bir gelişme olabilir (68).

MIN'in sporadik kolon, endometrial, pankreatik, özafageal ve gastrik tümörler içeren endodermal orjinli dokularda predominant olarak meydana geldiği saptanmıştır (69). Gastrik tümörlerin % 24 'ünde, özafagus adenokarsinomunun %13ünde MIN gösterilmiştir. Mutatör fenotip, bazı tümörlerde patolojik ve prognostik önem taşımaktadır. Örneğin, iki veya daha fazla lokusta MIN + gösteren kolonik tümörler, daha iyi prognoz göstermektedirler (57,70)

LOH, ailesel veya sporadik kanserlerde sıklıkla görülen, kromozomun bir kısmının veya tamamının kaybıyla dikkati çekmiştir. Mekanizma; "non-disjunction" (ayrılama), mitotik rekombinasyon (kromozomun distalinde kayba neden olur) veya de novo interstitial delesyon ile oluşabilmektedir. Bu yollardan herhangi biriyle, tümör supresör genine yakın bir markerin allelinin kaybolduğu görülür. Böylece, kişi o marker için heterozigot ise tümör dokusunda heterozigosite kaybı olur, hücre o marker yönünden homozigot veya hemizigot hale gelir. Markerler için homozigot delesyon (her iki allel kaybı), tümör hücrelerinde dahi nadir görülmektedir (45). Tümörlerde, LOH bölgesine yakın bir yerde bulunan tümör supresör gen, kaybolur yada inaktif hale gelir. Melanomlarda 9p, 10q, 6q ve 11q kromozom bölgelerinde allel kaybına sıklıkla rastlandığı belirtilmiştir (71).

İnsan kanserlerinin hepsinin oluşumu, genomik instabiliteyle bağlantılıdır. 1980'li yılların sonunda Vogelstein grubu, pek çok kolorektal kanserde büyük kromozomal segment kayıpları olduğunu ve bunun gelişigüzel bölgelerde olmadığını gösterdiler (72) Kromozomal delesyonlar, RFLP analizinden yararlanılarak, normal ve tümör örneklerinin karşılaştırılması ile saptanabilmektedir. Bir bireyin genomunda anne ve babasından gelen alleller arasındaki heterozigosite, bu yöntemle tanımlanabilir. Bu allel bandlardan birinin kaybı, LOH olarak tanımlanmıştır. LOH, sadece tümöre ait dokularda görülmekte normal dokuda ve tümör etrafındaki normal dokularda (cerrahi uçlar) gözlenmemektedir (68).

Mao ve arkadaşları (62), 100 baş-boyun, mesane ve akciğer kanser vakasında normal ve tümör dokularında karşılaştırmalı olarak MIN taraması yapmışlar (52 marker için) ve %

26'sında en az bir lokusta değişiklik göstermişlerdir. Yazarlar, dinükleotid tekrarlarından çok tri- ve tetranükleotid tekrarlarında MIN görölme olasılığının daha fazla olduğunu ve bunlardan MIN gösterilmesinin daha anlamlı olduğunu savunmaktadır (73).

2.2.4 Malign melanom ve mikrosatellit instabilitesi :

Otuziki melanom vakasında yapılan çalışmada 11 no'lu kromozomda LOH ile birlikte sadece iki vakada MIN görölümüş, ancak MIN+ vakaların hiçbirinde hMSH2 ve hMLH1 geni defekti saptanmamıştır (71).

Kırkbir primer kutanöz melanom ve otuziki benign melanositik nevüste yapılan ve tüm kromozomlara yayılan LOH çalışmasında Healy ve arkadaşları (74) 9p (% 46), 6q (% 31), ve 18q (% 22) da LOH saptadılar ve bu kayıpların melanom gelişimi ile ilgili olduğunu belirttiler.

9p21'de melanom gelişimi ile ilgili bulunan ve MLM olarak adlandırılan bir gen bölgesi, 84 melanom hücre hattında fiziksel haritalama yöntemi ile gösterildi (75). 9p21 kromozom bölgesindeki LOH'un, sporadik melanom gelişiminde önemli olabileceği belirtilmektedir. Bulgular, 9p21 bölgesinin, melanom patogenezi ile ilgili bir veya daha fazla tümör supresör gen içerebileceği (MTS1 /CDKN2 gibi) şeklinde yorumlanmaktadır (76).

Quinn ve arkadaşları (46), insan cilt kanserlerinde RER frekansının önemini araştırdılar. 47 bazal hücreli karsinom, 49 skuamoz hücreli karsinom, 41 primer malign melanom, 19 aktinik keratöz ve 20 Bowen's vakasında on veya daha fazla mikrosatellit marker ile yaptıkları incelemede sadece % 5 oranında MIN belirlemişlerdi. MIN frekansı ile mismatch tamir genleri arasında ilişki olduğunu da vurgulamışlardır.

Peris ve arkadaşları (76) farklı mikrosatellit bölgelerde yaptıkları benzer bir çalışma ile sporadik melanomda % 20 oranında MIN belirlediler. MIN pozitif ve negatif vakalar arasında klinikopatolojik özellikler yönünden bir fark görmediklerini belirttiler.

Schwartz ve arkadaşları da (77), 1p22, 5q11.2-13.3, 6q21-23.3, 9p21, 11p15.2, 17p13.1 ve 18q11 bölgelerine spesifik mikrosatellit markerleri ile yaptıkları çalışmada % 30 oranında MIN belirlediler. Bu oran daha önce çeşitli karsinomlar için belirlenenden düşüktür.

2.2.5 11 no'lu kromozomun malign melanom ile ilişkisi :

Kutanöz malign melanom, son iki yılda insidensinde artış görölün bir malignansidir. Kutanöz malign melanom oluşumu ve tümör gelişimi, multipli genetik lezyonların birikimi sonucu görölünmektedir ve bu gelişme için, karyotipik incelemelere ve LOH çalışmalarına

dayanan birkaç genetik modelden söz edilebilir (78). Melanom evolüsyonunda erken genetik değişikliklerin anlaşılması, tedavideki gelişmelere ışık tutacaktır. Nevüslerde ve melanomda yapılan karyotip analizlerinde pek çok kromozomda klonal yapısal anomali (1, 6, 7, 9 ve 11 no'lu kromozomlarda) saptanmıştır. Kutanöz melanomda; 9p, 1p, 6p, 11q ve 10q kromozomları üzerinde LOH bölgesi tanımlanmasına rağmen; henüz aday supresör gen bilinmemektedir. Sporadik ve ailesel melanom patogenezi ile ilgili olarak geniş, malign melanom ailelerinde yapılan çalışmalarda (79,80) 1p36 bölgesi ile 9p21'deki CDKN2 geni (p16^{INK4} proteini), olası melanom geni olarak belirlenmiştir.

Malign melanom vakalarında sitogenetik ve moleküler genetik yöntemlerle, çeşitli değişiklikler belirlenmiştir. Herbst ve arkadaşları (78), 11q bölgesi ile ilgili beş mikrosatellit bölgesinde PCR ile yaptıkları çalışmada 11q23 bölgesinde yoğunlaşan anomali belirlediler. Sitogenetik veriler de, melanom patogenezinde kromozom 11q'nun önem teşkil ettiğini desteklemektedir (71).

Meme kanseri, servikal kanser ve ovarian tümörlerde kromozom 11q üzerinde aynı lokusta LOH saptanmış ve ilgili bölgede bir tümör supresör gen olabileceği düşünülmüştür (81). 11q22-qter arasındaki bölgenin birçok tip tümörde kaybolduğu belirtilmektedir. Tomlinson ve arkadaşları (71) yaptıkları araştırmada 11q allel kaybı ile meme kanseri metastazı arasında bir ilişki olabileceğini göstermişlerdir. Benzer şekilde Walker ve arkadaşları (82) ile Chung ve arkadaşları (83) D11S29 lokusunda yaptıkları çalışmada 11q'da daha düşük sıklıkla LOH belirlediler.

Moleküler genetik ve sitogenetik çalışmalar; insan malign melanom gelişimi sırasında 11.kromozomdaki kromozom kırılması, düzensizlik ve kayıpların oluşumunun, önemli rol oynadığını desteklemektedir. 11q'da melanom gelişiminden sorumlu tümör supresör genin bulunma olasılığı, yüksek görülmektedir (84).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER :

Çalışma, iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir :

-Melanositik nevüslerde ve malign melanomlarda primer hücre kültürünün kurulması ve sitogenetik analizi

-Melanositik nevüslerde ve malign melanomlarda mikrosatellit instabilitesinin araştırılması

3.1 Primer hücre kültürü ve sitogenetik analiz için kullanılan solüsyonlar :

Kültür Ortamı :

a- Melanositik nevüs kültürü için kültür ortamı :

Melanosit Ortam Kiti (Sigma MMK-2) :

- M-1669 Melanosit Bazal Ortamı 500 ml
- M-1794 Melanosit ortamı (supplement) 5 ml

Ortam; MCDB 151 ve MCDB 104'ün modifiye edilmesiyle oluşturulmuş bir ortamdır. Hormon, büyüme faktörü veya diğer proteinler, antibiyotik, antimikotik içermemektedir.

Supplement ortamı; insan epidermal melanositlerinin çoğalması için gerekli maddeleri içerir. Bazal ortama eklenir. İçeriğinde sığır pitüiter ekstraktı (BPE), fetal sığır serumu, sığır insülini, sığır transferrini, bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), hidrokortizon, heparin ve forbol-12-miyristat-13-asetat (PMA) bulunur.

MMK-2 ortamının hazırlanışı :

- Her iki ortam da gece boyu oda sıcaklığında bırakılarak ya da 37°C su banyosunda süratli çözülür. İyi çözülmediği durumda çökelti oluşabilir.

- Tamamen çözülmesi sağlanan ortamlar, elle veya vortekslenerek, köpürtmeden çalkalanır.

- İki ortam, hücre kültürünün kurulması aşamasında birleştirilir. Işıktan etkilenmemesi için şişe, alüminyum folyo ile kaplanır.

Karışımın içine 100 U / ml Penisilin, 100 µg/ml Streptomisin ve 2.5 µg/ml Amfoterisin B eklendi.

Ortamın saklanması :

-20°C 'de dondurulmuş olarak gelen stok ortamlar; bir kez eritildikten sonra tekrar dondurulmamalı ve 2-8°C 'de karanlıkta saklanmalıdır.

b-Malign melanom kültürü için kültür ortamı :

- RPMI 1640 (Biological Industries-01-100-1B)* % 83
- Fetal Dana Serum (Biochrom-S0113) % 17
- Penisilin (Biochrom-A2210) 100 U / ml
- Streptomisin (Biochrom-A2210) 100 µg/ml
- Amfoterisin B (Biochrom-A2610) 2.5 µg/ml

* Ortam, 200 mM L-Glutamin içermektedir.

Transport Ortamı :

- Ham's F10 (Flow-12-404-49) 95 ml
- Fetal Dana Serum (Biochrom-S0113) 5 ml
- Penisilin (Biochrom-A2210) 200 U / ml
- Streptomisin (Biochrom-A2210) 200 µg/ml
- Amfoterisin B (Biochrom-A2610) 5 µg/ml

Yıkama Ortamı :

- HBSS (Biochrom L2013) 100 ml
- Penisilin (Biochrom-A2210) 100 U / ml
- Streptomisin (Biochrom-A2210) 100 µg/ml
- Amfoterisin B (Biochrom-A2610) 5 µg/ml

Kollajenaz Stok Solüsyonu :

Liyofilize haldeki Kollajenaz (Sigma C1764), RPMI 1640 ortamında son konsantrasyonu 2000 U / ml olacak şekilde çözülür. 37°C ' de 2 saat karıştırılarak inkübe edilir. Bir gece + 4°C de bekletilir. Ertesi gün önce 0.45 µm, sonra 0.2 µm çapındaki filtrelerden geçirilerek steril edilir ve steril tüplere az miktarlarda bölünerek -20°C' de saklanır.

Hipotonik Solüsyon (Lamel üstü harvest için) :

4.56 gr. Sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) distile suda 500 ml ye tamamlanarak çözülür (% 0.8 Sodyum sitrat). Otoklavda $121^\circ C$ 'de 15 dk. 1 atm basınçta steril edilir. Oda sıcaklığında 3 aydan fazla saklanabilir.

Kolsemid (Biochrom L6211) :

Steril koşullarda stok konsantrasyonu 10 $\mu g/ml$ olan kolsemid solüsyonundan 0.01 $\mu g/ml$ olacak şekilde kültürlerle eklenir.

Gurr Tamponu (pH :7.0) :

8 gr NaCl (Merck) ile pH :7.0 Gurr tableti (BDH 33 200) 1000 ml ye tamamlanacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanır. Otoklavlanarak steril edilir. Oda sıcaklığında 3 aydan fazla saklanabilir.

Gurr Tamponu (pH :6.8) :

pH :6.8 olan Gurr tableti (BDH 33 199) 1000 ml ye tamamlanacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanır. Otoklavlanarak steril edilir. Oda sıcaklığında 3 aydan fazla saklanabilir.

Gimza Boya (Carlo Erba- Cat No.453616) :

500 ml 'lik stok Gimza boyasından 3 ml alınıp 77 ml pH :6.8 Gurr tamponu ile karıştırılarak çalışma solusyonu hazırlanır.

Stok Tripsin Solüsyonu (Bantlama için) :

100 ml distile su içinde 0.625 gr. (Difco 1 :250) Tripsin çözülür. Kapaklı tüplere 3 er ml küçük tüplere dağıtılır ve 3 aydan fazla $-20^\circ C$ 'de saklanabilir.

Tripsin çalışma solüsyonu (Bantlama için) :

77 ml pH :7.0 Gurr tamponu ile 3 ml stok tripsin solüsyonu karıştırılarak hazırlanır.

Fiksatif :

Metanol (Merck) ve Glasiyal Asetik Asit (Merck) 'ten (3 :1) oluşur. Harvest aşamasında taze hazırlanması gerekir.

3.1.1. Primer kültürün kurulması ve sitogenetik analiz için kullanılan yöntemler (85) :

Solid dokudan primer kültürün kurulması ve harvest işleminde (metafaz alanları elde edilimi) yöntem modifikasyonu yapıldı.

Steril koşullarda çıkarılan melanositik nevüs ve malign melanom dokuları, antibiyotikli transport ortamı içine konarak laboratuvara getirildi. Hastalardan elde edilen bu dokulardan, aşağıda belirtilen gerek ve yöntemler kullanılarak primer kültür kuruldu. Üretilen hücrelerden metafaz alanları elde edilerek sitogenetik analiz yapıldı.

Melanositik nevüs ve malign melanom örnekleri Üniversitemizin Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Patolojik tanı için ayrılan örneğin bir kısmı aseptik koşullarda en az 500 mg olacak şekilde transport ortamına alındı. Eksizyon sırasında olabilecek bakteriyel veya fungal kontaminasyonu ekarte edebilmek için örnek, yaklaşık bir saat kadar, transport ortamında bekletildi. Kültürün kurulmasına yönelik çalışmanın her aşaması aseptik koşullarda ve steril ekipmanlarla gerçekleştirildi.

Örnek, transport ortam içinden alınarak Yıkama ortamına kondu. Burada dokunun istenmeyen kısımları (sinir, yağ, kan kalıntıları, gibi) uzaklaştırıldı. Geriye kalan kısmının yarısı steril küçük kapaklı tüplere -20°C ' de saklanmak üzere alındı. Diğer yarısı ile de hücre kültürü kuruldu.

25 cm² lik flask (Greiner) içine 4.5 ml kültür ortamı ve 0.5 ml (200 U / ml) Kollajenaz eklendi. Bu karışımın 2 ml si petri kabına alındı.

Yıkama ortamında bekletilen doku, pens yardımı ile kültür ortamı içeren petri kabına alındı. Doku, burada bistüriyle iyice parçalandı.

Parçalanmış dokular, daha önce hazırlanmış flask içine steril pipetle alındı. Bir gece kollajenazlı ortamda, 37°C ' de ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi.

Ertesi gün, flask içindeki kollajenazlı ortam, dokularla birlikte steril-kapaklı tüp içine alındı ve 130 g de 10dk santrifüj edildi.

Süpernatant atıldı ve 5 ml yıkama ortamı eklenerek dokular homojenize edildi. Tekrar 130 g de 10 dk santrifüj edildi.

Süpernatant atıldı. Çöken hücreler üzerine 37°C'de ısıtılmış 6 ml kültür ortamı eklendi.

Ayrı bir yerde, aseptik koşullarda içlerine 22x22 mm boyutlarında steril lamel yerleştirilmiş, 6 adet steril-küçük petri kabı hazırlandı. Petri kapakları üzerine gelen doku örneğinin numarası ve petri kabı no' su yazıldı.

Kültür ortamında homojenize edilen hücre süspansiyonundan, her lamel üzerine 0.5 ml olacak şekilde eklendi. Lamel üzerinde damlacık şeklinde görülen bu ortam, hücreler yapıştıktan sonra (yaklaşık 1-2 gün sonra) 2 ml'ye tamamlanır.

Artan hücreler flask içine alınarak, 37°C sıcaklıktaki % 5' lik CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Haftada üç gün kültürler kontrol edildi ve haftada 1-2 kez beslendi.

7-20 gün içinde harvest aşamasına gelen kültürlerle 0.01 µg/ml kolsemid eklendi ve bir gece bekletildi.

Ertesi gün, kültürlerdeki mitotik aktivite izlendi. Mitoza giren hücrelerin çoğunlukta olduğu zamanda harvest işlemi başlatıldı.

Lamel üstünde üretilen hücrelerde uygulanan harvest (metafaz alanı eldesi) işlemi :

Çalışmanın tamamı oda sıcaklığında, aseptik koşullarda gerçekleştirildi. Hazırlanan hipotonik solüsyon ve fiksatif de oda sıcaklığında kullanıldı.

Petri kabı içindeki ortam aspire edildi. 2 ml hipotonik solüsyon eklendi ve 30 dk inkübe edildi.

Üzerine, yavaşça lamelin kenarından, 1 ml taze hazırlanmış fiksatif eklendi ve 10 dk bekletildi.

Solüsyonlar aspire edildi ve üzerine yavaşça 2 ml fiksatif eklendi. 15 dk bekletildi.

Fiksatif aspire edildi, 2 ml fiksatif eklendi ve 10 dk bekletildi.

Son işlem, en az üç kez tekrarlandı.

En son aşamada; metanol alevi ile sıcaklık oluşturuldu. Lamel üzerindeki fiksatif aspire edildi ve hemen 2-3 kez hızla lamel üzerine üflenerek hücreler patlatıldı ve lamel üzerinde fiksatif damlası kalmayana değin, çok kısa bir süre için, aleve tutuldu.

Inverted mikroskopta lamel üzerindeki metafaz kalitesi belirlendi.

Lameller, petri kabından pens yardımı ile çıkarıldı ve metal bir levha üzerine yerleştirildi. Sağ üst köşesine petri numarası yazıldı ve üzerine petrinin kapağı kapatıldı.

Bu şekilde lameller, 50-55°C 'de pastör fırınında eskitmeye alındı ve ertesi gün, kromozomları bantlamak üzere boyandı.

Kromozom bantlama yöntemi :

Fırında eskitilmiş lameller soğuduktan sonra, taze hazırlanmış Tripsin çalışma solüsyonuna batırılarak 50-60 sn bekletildi.

Gurr (pH :7.0) tamponunda yaklaşık 1 dk çalkalandı.

Taze hazırlanmış Gimza boyasında 10 dk bekletilerek boyandı.

İki ayrı distile su değişimi ile çalkalandıktan sonra kurumaya bırakıldı.

Kurumadan sonra lamel ters çevrilerek entellan damlatılmış lam üzerine kapatıldı (Hücre tabakası içte kalacak şekilde) kapatıldı.

Preparat kuruduktan sonra, ışık mikroskobunda (Leitz) analiz yapıldı. Lamel üzerindeki tüm metafaz alanları değerlendirilmeye alındı. En az altı hücrenin karyotipik analizi yapıldı. Diğer metafaz alanlarında sayısal ve yapısal aberasyonlar yönünden ayrıntılı inceleme yapıldı. Bazı metafaz alanları, 25 ASA AGFA ortokromotik filme çekilerek negatif film oluşturuldu ve fotoğraflandı. Sitogenetik analiz; ISCN 1995 (86) sistemine göre 400 - 500 bant rezolüsyonunda en az 20 bantlı metafaz alanında yapıldı.

3.2 Mikrosatellit instabilitesinin tayini için kullanılan solüsyonlar :

Lizis Tamponu :

- % 1 SDS (Sigma L4390)
- 500 mM Tris-Cl pH :8.9
- 20 mM EDTA
- 10 mM NaCl

Proteinaz K (Sigma P4914) :

Proteinaz K distile suda çözülerek 20 mg / ml olacak şekilde stok solüsyon hazırlanır. DNA izolasyonu sırasında her tüp için 500 µg/ml (2.5µl) kullanıldı.

1 x TE Tamponu :

- 10 mM Tris HCl pH :8.0
- 1 mM EDTA pH : 8.0

10 x TBE Tamponu (pH :8.4) :

- 108 gr 0.04 M Tris-baz (Stratagene Cat.No.300172)
- 55 gr Borik asit (Sigma B6768)
- 40 ml 0.5 M EDTA (pH :8.0)

distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

EDTA (0.5 M) :

- 186.1 g Na₂EDTA.2H₂O (Sigma E5134)
- 700 ml dH₂O eklendi

10M NaOH ile pH :8.0'a ayarlanıp distile su ile 1000 ml ye tamamlandı.

Amonyum Persülfat (% 10) :

1 gr. Amonyum persülfat (Sigma A9164) distile su ile çözülüp 10 ml ye tamamlandı sonra karanlıkta -20°C'de saklandı.

Stop tamponu (Denatürasyon tamponu) :

- 950µl % 95 Formamid (Sigma F7508) - Stok
- 10µl % 0.025 Brom fenol (Sigma B5525)
- 10µl % 0.025 Ksilen siyanol (Sigma X4126)
- 40µl 20 mM EDTA, vorteksenerek karıştırıldı ve +4°C 'de saklandı.

Gümüş Nitrat Solüsyonu :

- 375 mg AgNO₃ (BDH 30087) 250 ml ddH₂O ya tamamlanarak çözüldü
- % 0.056 Formalin (% 37'lik stoktan 100µl / 100 ml) eklendi

PAGE Fiksatif :

- 100 ml Glasiyal Asetik Asit (Riedel)
- 100 ml Metanol (Yerli - % 99.5 v/v)
- 1000 ml dH₂O ya tamamlandı.

Developer Solüsyonu :

- 12 gr Na₂CO₃ (fotoğrafik grade) 400 ml ddH₂O 'da çözüldü

- % 0.019 formalin (% 37'lik stoktan 50µl / 100 ml) olacak şekilde eklendi
- % 20 lik NaOH ile pH :11.9' a ayarlandı

% 10 luk Etanol (Carlo Erba Cat.No.64-17-5) :

100 ml Etanol (Yerli - % 99.5 v/v), 1000 ml dH₂O ya tamamlandı.

% 1 lik HNO₃ :

Stok HNO₃ ten (Merck - % 65 v/v) 5 ml alınarak 250 ml ddH₂O'ya tamamlandı.

3.2.1 Mikrosatellit instabilitesinin tayini için kullanılan yöntemler :

Parafin bloklardan DNA izolasyonu (87,88) :

DNA izolasyon yöntemi, modifiye edilerek uygulandı. Hazırlanan solüsyonların hepsi steril edildikten sonra kullanıldı.

- Lam üzerine alınmış dokular, 30 dk şale içindeki Ksilol'de (Merck) bekletildi
- % 99, % 95 ve % 70 Etil alkol içerisinde 5 er dk bekletildi
- Islak doku kesitleri tüp içerisine alındı
- 100µl lizis tampon eklendi
- 500 µg/ml (2.5µl) olacak şekilde proteinaz K stoktan (Sigma P4914) eklendi
- Parmak ucu ile vurarak karıştırılan tüpler, 58 °C de bir gece inkübe edildi
- Örnekler 5 dk suda kaynatıldı (proteinaz K inaktivasyonu için). 200µl lizis tamponu eklendi
- Tüp içinde total hacim 300µl ye yükselmiş oldu. Bu tüp içine 1 :1 oranında fenol (pH :8.0) eklendi (300µl) ve vortekslendi
- 13.000 g de 10 dk + 4 °C de santrifüjlendi. Süpernatanı yeni bir ependorf tüpe alındı (300µl)
- Fenol-kloroform-izoamilalkol karışımından (25 :24 :1) 1 :1 oranında eklendi ve vortekslendi
- 13000 g de 10 dakika + 4 °C de santrifüj edildi
- Süpernatan 500µl lik tüpe aktarıldı ve 1 :1 oranında soğuk izopropanol eklendi
- Vortekslendi. 20 dk (veya bir gece) -20 °C de bekletildi
- 13000 g de 10 dk +4 °C de santrifüjlendi
- Alkol bölümü döküldü
- Tüp yatık kurutuldu (yaklaşık 1-4 saat)
- Örnekler, 30µl 0.2 TE tamponunda çözüldü

- İyice çözülebilmesi için bir gece 37 °C de inkübe edildi
- Kalıp DNA olarak kullanılmak üzere - 20 °C de saklandı.

3.2.2 Mikrosatellit markerleri :

Parafin bloklardan izole edilen DNA örneklerinde, dört ayrı mikrosatellit markeri ile genomik değişikliklerin varlığı araştırıldı.

D2S123 primerlerinin baz dizisi (89);

Sens (F) 5' - AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA - 3'

Antisens (R) 5' - GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC - 3'

D14S65 primerlerinin baz dizisi (90) ;

Sens (F) 5' - GCT CCA CCC CCT AAA GAT CC - 3'

Antisens (R) 5' - TAC ACC CTG TGG AAA GGC TG - 3'

BAT40 (3-β-hidroksisteroid dehidrogenaz) primerlerinin baz dizisi (89);

Sens (F) 5' - ACA ACC CTG CTT TTG TTC CT - 3'

Antisens (R) 5' - GTA GGA CAA GAC CCA CTT G -3'

D11S29 primerlerinin baz dizisi (71);

Sens (F) 5' - TCT AGC TCC ACC ATC CTG TG - 3'

Antisense (R) 5' - ACA ACA CAC TGC CAC AAG AC - 3'

Tablo 2 : Mikrosatellit markerlerinin özellikleri

Marker	Kromozomal lokasyonu	Allel büyüklüğü (bp)	Baz tekrarı	Heterozigosite
D2S123	2p	227-215	(CA)n	0.76
D14S65	14q	125-149	(CA)n	0.79
BAT40	3-β-hidroksisteroid dehidrogenaz	90-130	(A)n	-
D11S29	11q23.3	143-163	(CA)n	0.77

Melanositik nevüs ve malign melanom patolojik tanısı konulan 22 örneğin tümör ve tümör etrafından alınan normal dokularından DNA izole edildi. İzole edilen bu DNA'lar kalıp olarak kullanılarak, marker bölgeler, yukarıda belirtilen primer çiftleri kullanılarak PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltıldı. Her marker için mikrosatellit bölgesinde olası değişiklikler, aynı örneğin tümör ve normal dokuları karşılaştırılarak analiz edildi.

PCR Reaksiyonu :

Hücre genomunda mononükleotid ve dinükleotid tekrar bölgelerinin çoğaltılması amaçlandı. Olası genomik değişimlerin olduğu bölge, yukarıda tanımlanan markerlerin yardımı ile PCR içeriği ve uygun sıcaklık profili kullanılarak amplifiye edildi.

Tablo 3 : Mikrosatellit markerleri ile kurulan PCR reaksiyonlarında kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları

		Son konsantrasyon
Kalıp DNA	2 - 4µl	
dH ₂ O	4 - 5µl	
10xBuffer	1µl	1 x
dNTPmix (Stratagene 200415-51)	1µl	200 µM
MgCl ₂	1µl	2.5 mM
Primer (F)	0.4µl	40 pmol
Primer (R)	0.4µl	40 pmol
Taq Polimeraz	0.3µl	1.5 U
Toplam Hacim	10µl	
Mineral yağ	10µl	
Stop tamponu	10µl	

Reaksiyon tüpüne kalıp DNA eklendikten sonra +2°C ' de bekletildi Reaksiyon karışımı hazırlanırken, kimyasallar yukarıda belirtilen sıraya göre eklendi. Karışım vortekslendi ve santrifüjde spin yapıldıktan sonra, kalıp DNA üzerine, her tüpe total hacim 10µl olacak şekilde eklendi. Üzerlerine 10µl mineral yağı da eklenerek tüplerin üzeri kapatıldı. PTC - 100 Thermal Cycler cihazında aşağıdaki profilde amplifikasyon başlatıldı.

PCR amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık profili;

İlk denatürasyon 94°C ' de 5 dk., her bir döngü 94°C 'de 1 dk / 55°C ' de 1 dk / 72°C ' de 1 dk 20 sn ve son uzama 72°C ' de 7 dk olacak şekilde, toplam 30 döngüde gerçekleştirildi.

Amplifikasyon tamamlandıktan sonra her tüpe 10µl stop tamponu eklendi ve - 20°C ' de saklandı.

Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) :

Cam levhaların hazırlığı :

Jel, 20x24x0.04 cm boyutlarında cam levhaya döküldü. Cam levhaların temizliğine önem verildi.

Cam levhalar önce temiz bir alana yerleştirildi. Arka ve ön yüzü % 70 ' lik EtOH ile iyice temizlendi.

Levhalarından birinin yüzü Metakrilat ile, diğerinin yüzü ise Akrilaz (veya SDS) ile iyice temizlendi. Metakrilat (100µl) cam yüzeye iyice yedirildikten sonra EtOH ile tekrar temizlendi. Akrilaz ile muamele edilen cam yüzey de EtOH ile temizlendi (SDS kullanılıyorsa, EtOH ile temizlenmemelidir).

Cam levhalar hazırlandıktan sonra, jel hazırlanana kadar birleştirilmedi.

Jelin hazırlığı :

% 8 lik poliakrilamid jel kullanıldı :

- 100 mg Bisakrilamid (Sigma M2022)
- 2 gr Akrilamid (Stratagene 300011)
- 12 gr Üre (Sigma U1250)

Tartılan bu kimyasallar üzerine 12 ml 1 x TBE tamponu eklendi ve sıcak su içine konmuş bir beher içinde çözüldü. Soğuduktan sonra 0.45 µm çaplı filtreden geçirilerek filtre edildi.

Jelin cam levhaya dökülüşü :

Metakrilatlı cam yüzeyinin iki kenarına 0.04 cm kalınlığında spacer (aralayıcı) yerleştirildi. Cam levhalar, Metakrilat ve Akrilaz'lı kısım yüz yüze gelecek şekilde kapatıldı ve kenarlarından klemplerle tutturuldu.

Filtre edilmiş solüsyonun üzerine, 30µl TEMED (Sigma T7024) ve 150µl %10 luk Amonyum persülfat (Sigma A9164) eklendi ve hemen enjektöre çekilerek cam levhaların arasına dolduruldu. Jel donmadan, uç kısma tarak ters olarak yerleştirildi ve geri kalan jel de tarağın etrafına döküldü. En az iki saat jelin donması için beklendi.

Denatürasyon :

Çift iplikli DNA'nın tek ipliklere ayrılması ve bu pozisyonda sabit tutulması amacıyla PCR örnekleri jele yüklenmeden önce, 95°C 'de 5 dk (Thermal Cycler'da) bekletilerek denatüre edildi. Hemen buz üzerine alındı ve jele yüklenene kadar + 4°C ' de bekletildi.

Jel, tanka vertikal olarak yerleştirildi. Cam levhanın arkasına metal levha, klemplerle sıkıştırılarak yerleştirildi. Böylece jelin elektroforez sırasında ısıtılması sağlandı.

Örnekler, jele yüklenmeden önce, 30 W da 30 dk ön yürütme yapıldı. Cam levhanın ısınması sağlandı. Tarak, jele yerleştirildi.

+ 4°C ' de bekleyen denatüre edilmiş örnekler, güç kaynağı kapatılarak her kuyuda 3.5 µl örnek olacak şekilde yüklendi.

Yükleme sırasında her doku örneğine ait tümör ve normal DNA'lar yan yana yüklendi.

Mikrosatellit markerlerinin büyüklüğüne göre,

D2S123 25 W / 150 dk

D14S65 25 W / 80 dk

BAT40 25 W / 60 dk

D11S29 25 W / 120 dk yürütüldü.

Gümüş nitrat ile boyama (91,92) :

Elektroforez sonunda, iki cam levha birbirinden ayrıldı. Düz cam üzerindeki jel aşağıda belirtilen kimyasallarla verilen sıraya göre ve belirtilen sürelerde boyama işlemi gerçekleştirildi :

Tablo 4 : Gümüş boyamada kullanılan maddeler ve inkübasyon süreleri

PAGE Fiksativ	40 dk
Hibridizasyon fırınında kurutma	30 dk
% 10 Etanol	5 dk
% 1 HNO ₃	2 dk
AgNO ₃	60 dk
ddd H ₂ O (Ultra saf su)	1 dk
Na ₂ CO ₃ (pH : 11.9)	10-15 dk
ddd H ₂ O	1 dk
Hibridizasyon fırınında kurutma	30 dk
Fotoğraflama	

Fotoğraflama :

Nükleer Tıp Anabilim Dalı'nın diyagnostik amaçlı kullanmış olduğu yeşil ışığa duyarlı (clear-base tip Fuji film) negatif filmler kullanıldı. Kırmızı ışığa duyarlı olmayan bu filmlerin beyaz yüzü agridizörde jelin altına yerleştirildi. Diyafram iyice kapatılarak 4 - 5 sn kadar ekspozite edildi.

1 : 3 oranında hazırlanmış olan Ilford Bromophen kart banyosunda, film siyahlaşana kadar bekletildi. Glasiyal asetik asitli suda çalkalandıktan sonra % 10 oranında hazırlanmış olan sodyum hiposüfit' te (developer) develope edildi.

Jelden direkt olarak karta da basıldı. Ilford'un 3 numaralı kartı jelin altına yerleştirildi. Bu arada çalışma ortamında sarı filtre kullanıldı. Kapalı diyaframda 15 - 20 sn ekspozite edilerek yukarıda tanımlanan kart banyosunda aynı şekilde banyosu yapıldı.

4. BULGULAR :

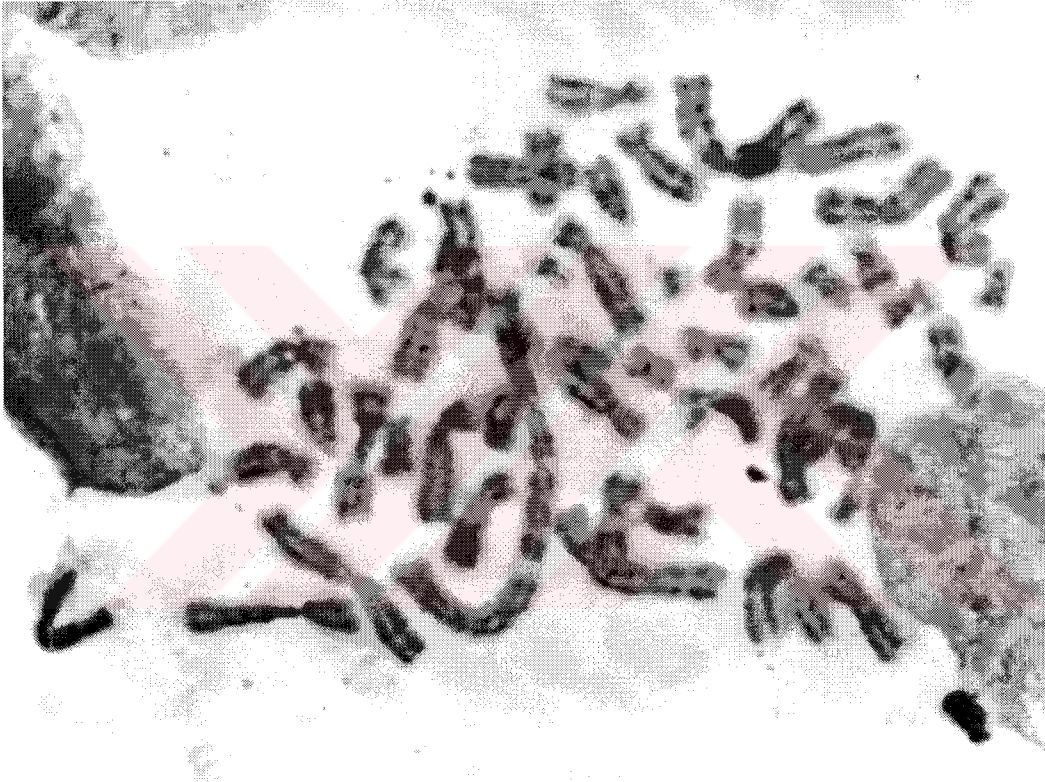
4.1 Primer hücre kültürü ve sitogenetik analiz sonuçları :

Dokuzu malign melanom, altısı melanositik nevüs olmak üzere toplam onbeş örnekten primer kültür hazırlandı (Tablo 5). Biri intradermal nevüs diğer ikisi malign melanom olmak üzere, çalışılan örneklerin üçünde bilinmeyen nedenlerle, üreme olmadı. İki malign melanom örneğinde yapısal anomali saptandı. Malign melanom klinik ve patolojik tanısı konan ST-96-0001 no'lu vakada; (67 yaşında, kadın) sol ayak topuğundan alınan eksizyon örneğinde yapılan sitogenetik analiz sonucunda üç hücrede 47, XX + marker (Şekil 3) gözlemlendi. Analiz edilen diğer hücrelerinde de klonal olmayan anomaliler belirlendi. ST-96-0040 no'lu vakada ise (74 yaşında, kadın), iki hücrede (klonal) 46, XX t (7;12) (q22;q24), t (2;11) (p25;q22) translokasyonları (Şekil 4) saptandı. Bu vakanın diğer hücreleri normaldi (Şekil 5). Yedi ve oniki nolu kromozomlar arasındaki kırılma bölgeleri daha önceki malign melanom çalışmalarında da saptanmıştır (93). Aynı vakanın abdominal bölgesinden alınan lezyonun da malign melanom olmasından şüphelenildi (ST-96-0002) ancak sitogenetik analiz sonucunda, klonal anomali görülmedi. 46, XX karyotipi saptandı.

MMK - 2 ortamında üretilen melanositler; in vitro koşullarda bipolar, dendritik morfolojiye sahiptir (Şekil 6). Melanositik nevüslerin in vitro koşullarda üreyebilmesi için gereksinim duydukları mitojenler ve büyüme faktörleri, MMK -2 ortamında bulunmaktadır. RPMI 1640 ortamında ise metastatik melanom hücreleri üretilmiş olup fibroblast benzeri morfoloji göstermektedirler (Şekil 7).

Tablo 5 : Melanositik nevüslerde ve malign melanomda primer hücre kültürü sonrası elde edilen sitogenetik analiz sonuçları

Lab. No.	Yaş / Cinsiyet	Eksizyon Bölgesi	Klinik Tanı	Patolojik Tanı	Sitogenetik sonuç
ST-96-0001	67 / K	Sol ayak topuğu	Malign melanom	Malign melanom	47,XX,+marker
ST-96-0002	67 / K	Abdominal bölge	Malign melanom	Malign melanom	46, XX
ST-96-0003	22 / K	Sol kol	Nevüs	Dermal nevüs	46, XX
ST-96-0004	17 / E	Ayak bileği	İntradermal nevüs	Melanositik nevüs	46, XY
ST-96-0009	64 / E	Alt çene, ağız içi	Malign melanom	Malign melanom	46, XY
ST-96-0010	82 / E	Burun	Nevüs	Pigmente nevüs	46, XY
ST-96-0011	71 / K	Sol bacak anterior bölge	Malign melanom	Malign melanom	46, XX
ST-96-0012	71 / K	Sol bacak anterior	Malign melanom	Malign melanom	Üreme (-)
ST-96-0021	51 / E	Skalp	Nevüs	İntradermal nevüs	46, XY
ST-96-0029	19 / E	Sırt	İntradermal nevüs	İntradermal nevüs	Üreme (-)
ST-96-0030	21 / K	Burun	Nevüs	Pigmente nevüs	46, XX
ST-96-0031	46 / K	Alın derisi	Lentigo maligna	Malign melanom	46, XX
ST-96-0038	61 / E	Sağ lomber	Malign melanom	Malign melanom	46, XY
ST-96-0040	74 / K	Sol infraorbital	Malign melanom	Malign melanom	46,XX t (7;12) (q22;q24) t(2;11) (p25;q22)
ST-96-0041	52 / E	Sol ön kol	Malign melanom	Malign melanom	Üreme (-)

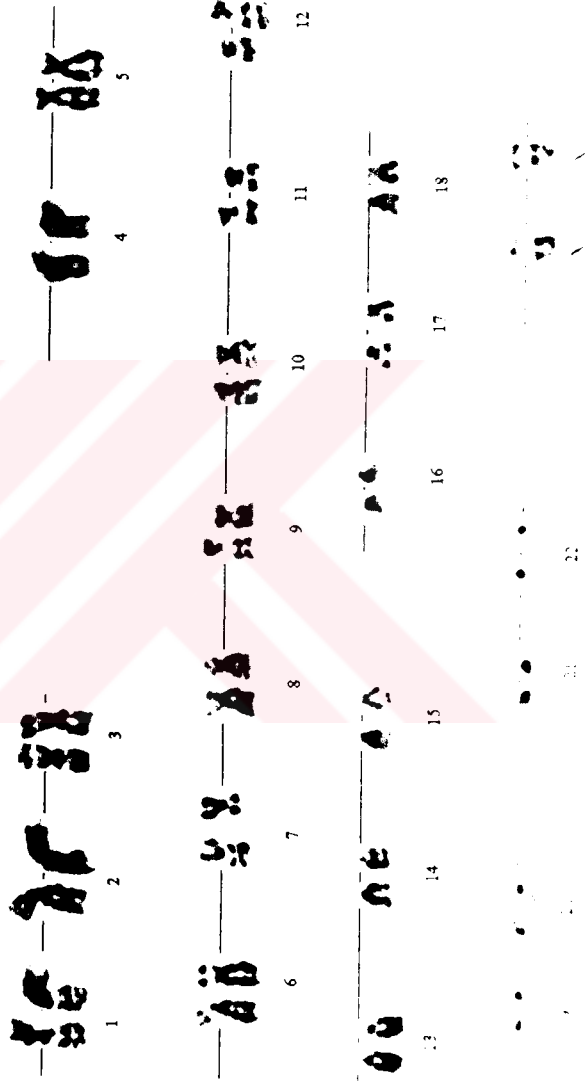


Şekil 3 : ST-96-0001 no'lu vakaya ait (malign melanom) 47,XX,+ marker metafaz alanı (1000X)



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENETİK ANABİLİM DALI
SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER GENETİK LABORATUVARI

LAB NO: ST-96-0040
KARYOTİP: 46, XX, (7;12)(q22;q24);(2;11)(p25;q22)



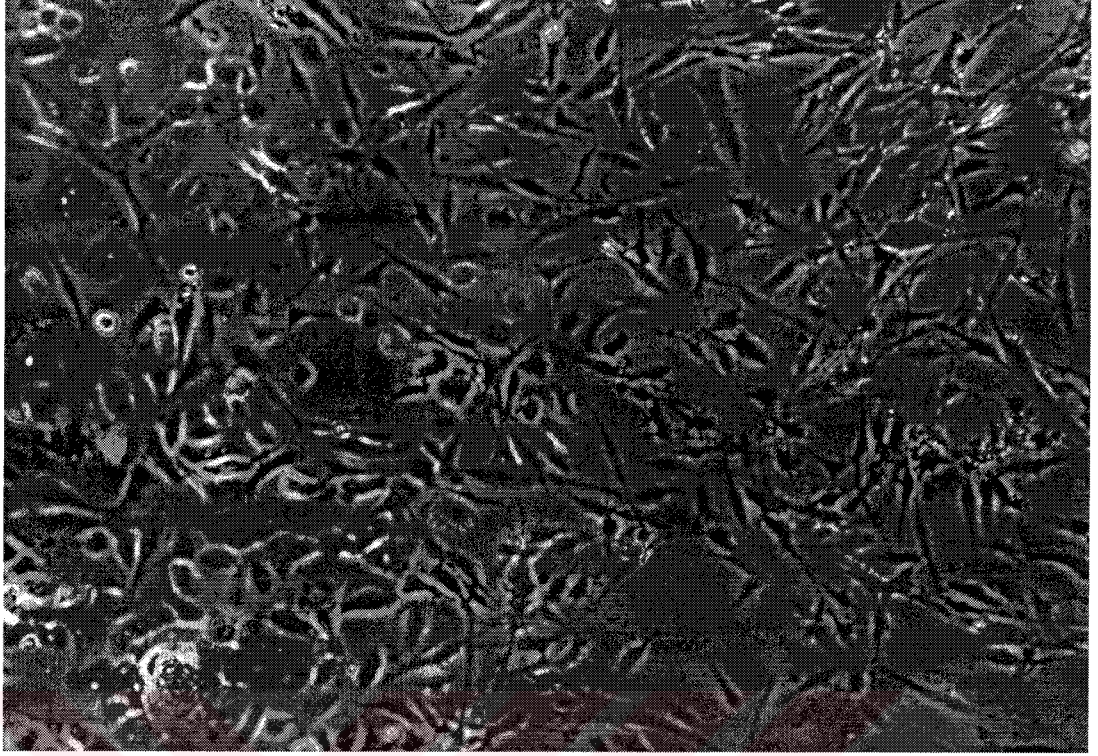
Şekil 4 : ST-96-0040 no'lu vakaya ait translokasyon anomalisi gösteren karyotip örneği (1000X)

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER GENETİK LABORATUVARI

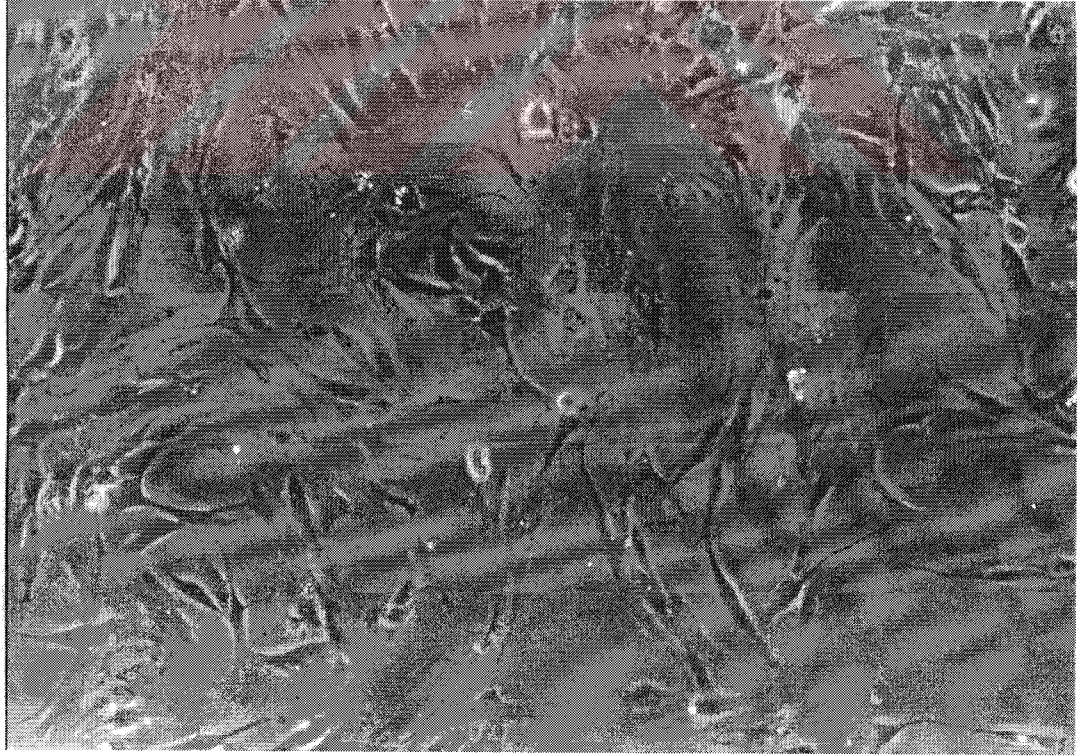
LAB. NO : ST - 96 - 0001
KARYOTİP : 46, XX



Şekil 5 : ST-96-0001 no'lu vakaya (malign melanom) ait normal karyotip örneği (1000X)



Şekil 6 : MMK-2 ortamında üretilen pigmente nevüse ait (ST-96-0030) primer hücre kültürü (100X)



Şekil 7 : RPMI 1640 ortamında üretilen malign melanoma ait (ST-96-0040) primer hücre kültürü (100X)

4.2 Melanositik nevüslerde ve malign melanomlarda mikrosatellit instabilite çalışma sonuçları :

Konjenital nevüs, displastik nevüs, “compound” nevüs ve malign melanom olarak patoloji tanısı konmuş olan 22 parafin blok seçildi. Ancak çalışma sırasında 14 no’lu örneğin pyojenik granülom olduğu farkedilmesi nedeni ile çalışma dışı bırakıldı. Her doku örneğinin tümör ve normal (tümör dokusu etrafındaki normal doku - cerrahi uç -) olmak üzere blokları seçildi. Mikrosatellit bölgelerde polimorfizm doğal olduğu için, tümörle, aynı kişinin normal dokusu karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı.

Çalışılan yirmibir örneğin; dördü displastik nevüs, altısı konjenital nevüs, dördü compound nevüs ve yedisi malign melanomdur. Bu örneklerden, tümör ve normalleri ayrı ayrı olmak üzere DNA’ları izole edildi. Dört ayrı mikrosatellit markeri kullanılarak bu örnekler, amplifiye edildi. % 8’lik poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldükten sonra gümüş boyama yapıldı ve fotoğraflanarak değerlendirildi.

Tablo 6 : Seçilen parafin blokların ve olguların klinik-patolojiközellikleri

Lab. No.	Patoloji No.	Dosya No.	Yaş/ Cinsiyet	Çıkarılan Bölge	Nevüs çapı (mm)	Klinik Tanı	Patolojik Tanı
T 1 N 1	7667 / 93	247790	41/K	Sırt derisi	10x5x2	Nevüs	Displastik nevüs
T 2 N 2	5380 / 94	380769	19/E	Sol kol Ekstensör yüz derisi	30x20x10 120x40x20	Konjenital dev kıllı nevüs	Konjenital nevüs
T 3 N 3	6004 / 91	285320	60/K	Sağ gastrocnemius üzeri cilt fascia arası doku	70x70x10	Nodüler MM	Malign Melanom Level V
T 4 N 4	3247 / 93	360711	65/E	Sırt derisi	5x5	MM	MM (subkutan nodül)
T 5 N 5	374 / 90	215433	71/K	Sol ayak tabanı	2 x 0.7	MM	Nodüler MM Level IV
T 6 N 6	6527 / 95	370037	42/K	Sağ kol Ekstensör yüz	55x40x2	Konjenital nevüs	Konjenital nevüs
T 7 N 7	9940 / 94	546624	-/K	Sırt	50x20x20	Nevüs	Konjenital melanositik nevüs
T 8 N 8	9808 / 94	156558	22/E	Sırt	13x6	Konjenital dev kıllı nevüs	Compound nevüs
T 9 N 9	5176 / 90	-	48/K	Sol uyluk	6 x 6 x 5	MM	MM
T 10 N 10	645 / 90	216592	12/K	Bel	0.3x 0.1x 0.1	Nevüs	Compound nevüs
T 11 N 11	11944 / 94	547959	82/K	Sol zigomatik bölge	35x20x5	Lentigo maligna	Lentigo MM Level IV

T 12 N 12	3391 / 92	308305	45/K	Sol yüz derisi	45x30	Lentigo malign melanom	Lentigo Maligna Nodüler melanom Level V
T 13 N 13	4781 / 91	237613	25/E	Sırt ve sol ayak kenarı	7x6x3 8x6x4	İntradermal nevüs	Compound nevüs
T 14* N 14	2004 / 95	574149	34/K	Sternum üstü	60x50x40	Pyojenik granülom	Pyojenik granülom
T 15 N 15	4803 / 95	259715	23/K	Sağ uyluk laterali	15x10x2 10x8x2	Konjenital nevüs	Compound nevüs
T 16 N 16	2163 / 92	175023	42/E	Sağ inguinal süperfisial lenf nodu (metastaz)	8x5	Malign melanom	Malign melanom
DN 16 N 16	2163 / 92	175023	42/E	Paraumbilikal bölge	30	Displazik Compound nevüs	Displastik nevüs
T 17 N 17	6604 / 91	175023	41/E	Sağ gluteal bölge alt fascia arası (1 yıl önce aynı bölgeden level IV MM eksize edilmiş)	110x650x40 25x12x6	Malign melanom	Malign melanom
T 18 N 18	33 / 93	173612	22/E	Sırt derisi	45x25	Konjenital kılı nevüs	Konjenital Compound nevüs
T 19 N 19	13176 / 94	556056	37/K	Sağ aksiller bölge	50x40x8	Konjenital dev kılı nevüs	Konjenital melanositik nevüs
T 20 N 20	356 / 91	127224	14/K	Mons pubis Skapula üzeri	45 x 15 x 4 10x10x3	Melanotik Nevüs	Konjenital, Compound nevüs
T 21 N 21	3583 / 92	220287	29/K	Regiombilicalis (Göbek çevresi derisi)	6x4	Displastik Nevüs Ailede MM öyküsü	Displastik nevüs
T 22 N 22	6193 / 91	220287	28/K	Bel-sağ yanı	30x18	Displastik nevüs Ailede MM	Displastik nevüs

* 14 no'lu vaka, patolojik tanısı pyojenik granülom olması nedeniyle çalışma dışı bırakıldı.

LOH ve mikrosatellit instabilitesinin değerlendirilmesi; informatif vakada iki allel bandın intensitelerini karşılaştırılarak gerçekleştirildi. LOH veya konstitüsyonel heterozigosite arasında sadece gözle inceleme ile ayırımın yapılması yeterli idi. Bir allelin densitesinde % 50 nin üzerindeki kayıp, LOH olarak değerlendirildi (78,94,95). Dört ayrı mikrosatellit bölgesinde saptanan MIN ve LOH, Tablo 7’de gösterilmiştir. Örneklerin normal dokularında heterozigosite kaybı ve mikrosatellit instabilite görülmediği için, tabloda sadece tümör ve bir vakada da displastik nevüse yer verilmiştir.

Çalışmada yirmibir örnek değerlendirilmeye alınmış ancak bazı eski bloklarda, tahminen, DNA izolasyonu sırasında eski olması nedeniyle değrede olduğu için, sonuç alınamamıştır. Örneğin dokuz numaralı örnekte, hiçbir markerde sonuç elde edilememiştir. Bunun yanısıra tümör (T) veya normal (N) dokulardan karşılaştırmalı çalışma yapıldığı için, dokulardan birinin değrede olması, o örneğin değerlendirilememesine yani non-informatif (NI) olarak sonuçlandırmamıza neden olmuştur.

Tablo 7 : Melanositik nevüs ve malign melanom örneklerinin tümör dokularında (T) ve displastik nevüste (DN) saptanan çeşitli mikrosatellit lokuslarındaki değişimler

T (Tümör)	Mikrosatellit Markerleri			
	D2S123	D14S65	BAT40	D11S29
T 1	-	-	NI	NI
T 2	-	NI	NI	NI
T 3	LOH	-	NI	NI
T 4	-	-	-	-
T 5	NI	-	NI	LOH
T 6	-	-	-	NI
T 7	-	-	-	-
T 8	NI	-	NI	NI
T 9	NI	NI	NI	NI
T 10	NI	NI	-	NI
T 11	-	-	-	NI
T 12	-	NI	-	-
T 13	-	-	NI	-
T 14*	-	-	-	-
T 15	NI	-	-	-
DN16	MIN	MIN	-	MIN
T 16	-	-	-	-
T 17	NI	-	-	NI
T 18	-	-	NI	-
T 19	-	-	NI	NI
T 20	-	-	-	-
T 21	-	-	-	-
T 22	LOH	-	MIN	-

*T 14 no'lu vaka pyojenik granülom olması nedeniyle çalışma ve değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Tablodaki Kısaltmalar :

(-) : Normal (Mikrosatellit instabilitesi saptanmadı)

T : Tümör

MIN : Mikrosatellit İnstabilitesi saptandı

LOH : Heterozigosite Kaybı (Loss of heterozygosity)

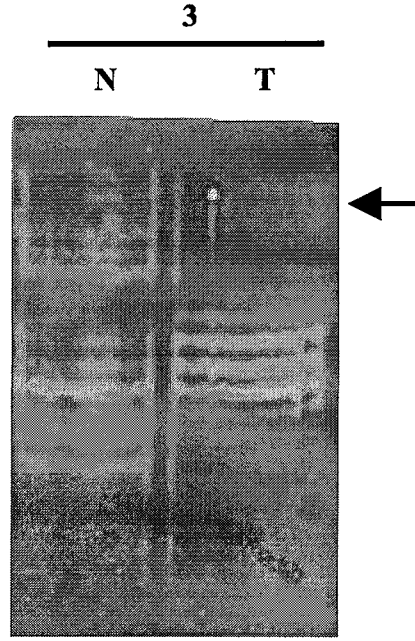
NI : Non-informatif (Değerlendirilemedi)

Üç nolu örnek; 60 yaşındaki bir kadın hastadan sağ gastrocnemius üzeri cilt fascia arası dokudan 70x70x10 mm boyutlarında alınmış ve malign melanom (Level V) patolojik tanısı konmuş bir örnektir. Bu vakanın izole edilen DNA'sı, dört ayrı markerle analiz edildi ve D2S123 bölgesinde heterozigosite kaybı (LOH)saptandı (Şekil 8).

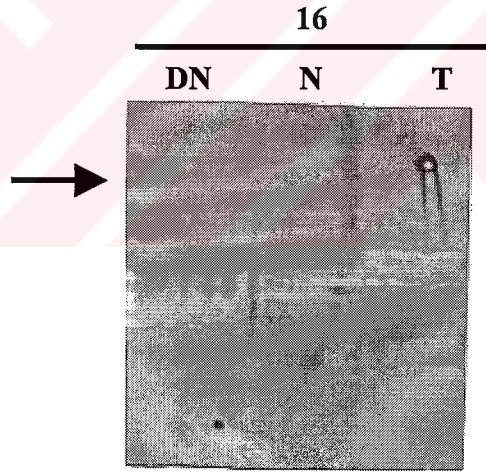
Beş nolu örnek; 71 yaşında bir kadın hastanın sol ayak tabanından 2x0.7 mm boyutlarında alınmış ve nodüler malign melanom (Level IV) patolojik tanısı konmuş bir örnektir. Bu vakanın izole edilen DNA'sı, dört ayrı markerle analiz edildi ve D11S29 markerinde heterozigosite kaybı (LOH) saptandı (Şekil 13).

Onaltı nolu örnek; 42 yaşında bir erkek hastanın sağ inguinal süperfisyal lenf nodu metastazından 8x5 mm boyutlarında alınmış ve malign melanom patolojik tanısı konmuş bir örnektir. Ayrıca bu vakanın paraumbilikal bölgesinden 30 mm boyutunda alınan lezyonda da displastik nevüs patolojik tanısı konmuştur. Bu vakanın her iki bölgesinden izole edilen DNA'ların dört ayrı markerle analizi yapıldığında, malign melanom tanısı konmuş olan tümör örneğinde mikrosatellit instabilitesine ve heterozigosite kaybına rastlanmadı. Ancak displastik nevüs örneği ile yapılan çalışmada, D2S123 (Şekil 9), D14S65 (Şekil 11) ve D11S29 markerinde (Şekil 14) mikrosatellit instabilitesi (MIN) saptandı.

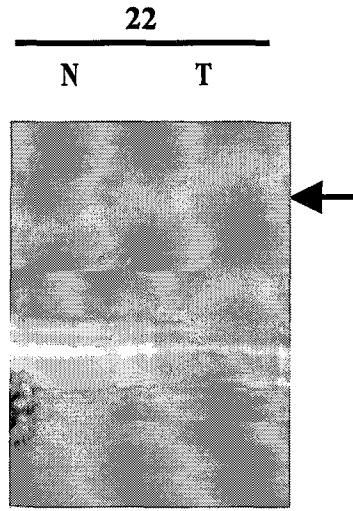
Yirmiiki nolu örnek; 28 yaşında bir kadın hastada, belin sağ yanından 30x18 mm boyutlarında alınmış ve displastik nevüs patolojik tanısı konmuş bir örnektir. Bu vakanın ailesinde malign melanom hikayesi vardı. İzole edilen DNA'larının dört ayrı markeri ile analizi yapıldı. D2S123 no'lu örnekte heterozigosite kaybı (LOH) (Şekil 10) ve BAT40 markerinde mikrosatellit instabilitesi (MIN) saptandı.



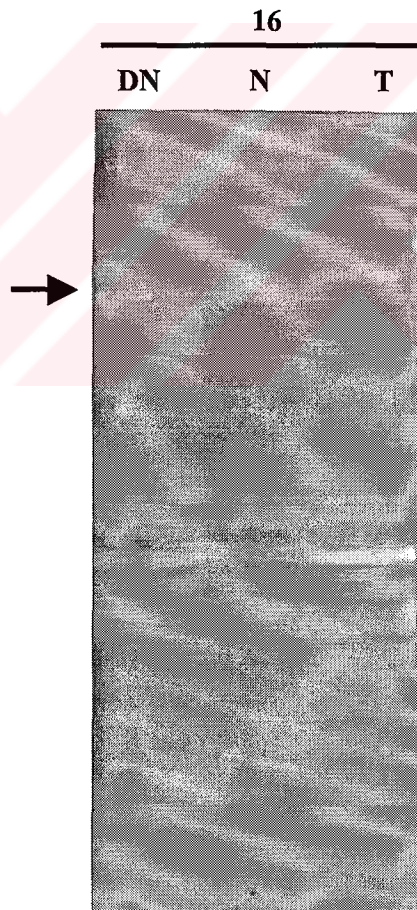
Şekil 8 : D2S123 markerinde 3 no'lu vakanın (malign melanom) tümör örneğinde (T) heterozigosite kaybı (LOH). N (Normal) T (Tümör)



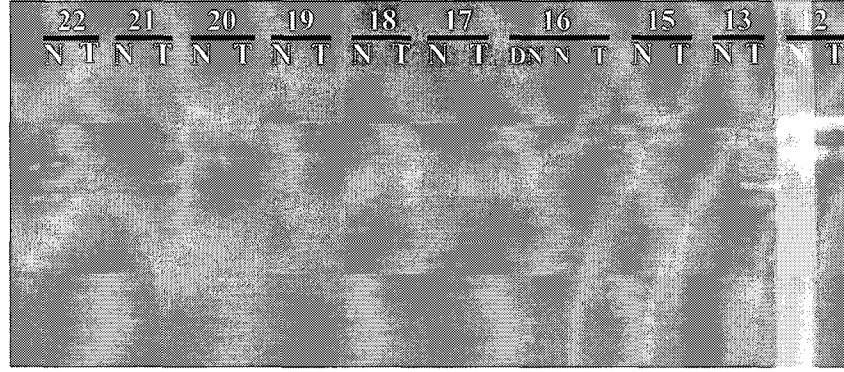
Şekil 9 : D2S123 markerinde 16 no'lu vakanın displastik nevüs'ünde (DN) mikrosatellit instabilitesi (MIN). N (Normal) T (Tümör) DN (Displastik Nevüs)



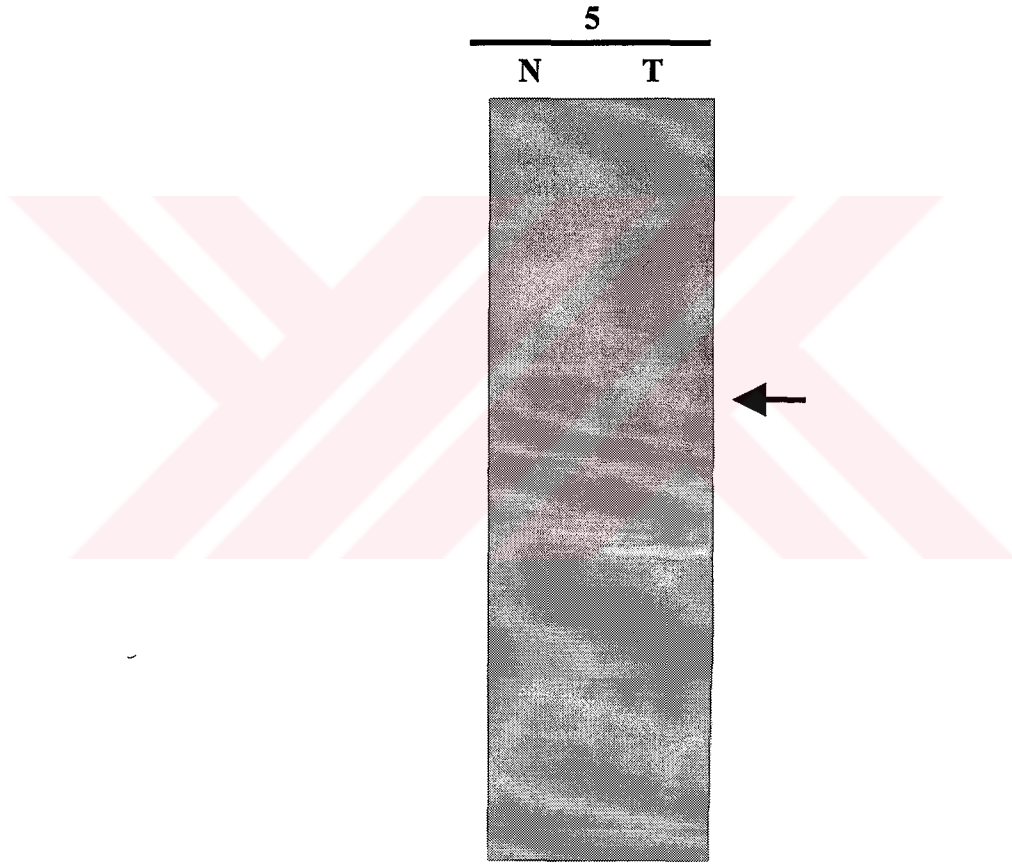
Şekil 10 : D2S123 markerinde 22 no'lu vakanın (malign melanom) tümör örneğinde (T) heterozigosite kaybı (LOH). N (Normal) T (Tümör)



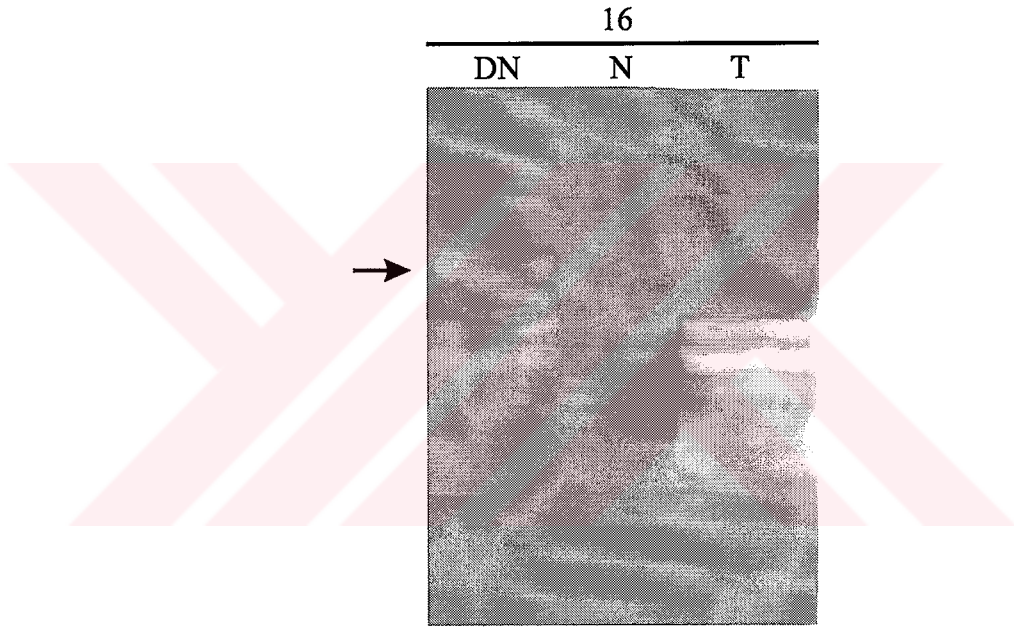
Şekil 11 : D14S65 markerinde 16 no'lu vakanın displastik nevüsünde (DN) mikrosatellit instabilitesi (MIN). N (Normal) T (Tümör) DN (Displastik Nevüs)



Şekil 12 : D11S29 markeri ile amplifiye edilmiş 12-22 vakaya ait örneklerin jeldeki görünümüleri N (Normal) T (Tümör) DN (Displastik Nevüs)



Şekil 13 : D11S29 markerinde 5 no'lu vakanın tümör örneğinde heterozigosite kaybı (LOH). N (Normal) T (Tümör)



Şekil 14 : D11S29 markerinde 16 no'lu vakanın displastik nevüs örneğinde mikrosatellit instabilitesi (MIN). N (Normal) T (Tümör) DN (Displastik Nevüs)

D2S123 markeri için vakaların % 71'i değerlendirilebildi. İkisi LOH ve biri MIN olmak üzere üç genetik değişiklik saptandı. D14S65 markeri için vakaların % 86 sında değerlendirme yapılabildi ve bir MIN saptandı. BAT40 markerinde % 57 oranında vaka değerlendirilmeye alınabildi ve bir MIN saptandı. D11S29 nolu marker ise onbir numaralı kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır. Bu markerle, vakaların % 52 si değerlendirilmeye alınabilmiş ve sonuçta bir LOH, bir MIN gözlenmiştir (Tablo 8).

Tablo 8 : Pigmente nevüs ve malign melanom örneklerinin farklı lokuslarında gözlenen Heterozigosite kaybı (LOH) ve mikrosatellit instabilitesi'nin (MIN) değerlendirilmesi

Lokus	Toplam vaka sayısı	Değerlendirilebilen vaka sayısı (%)	LOH görülen vaka sayısı (%)	MIN görülen vaka sayısı (%)
D2S123	21	15 / 21 (71)	2 / 15 (13)	1 / 15 (7)
D14S65	21	18 / 21 (86)	0 / 18 (0)	1 / 18 (6)
BAT40	21	12 / 21 (57)	0 / 12 (0)	1 / 12 (8)
D11S29	21	11 / 21 (52)	1 (11) (9)	1 / 11 (9)

5.TARTIŞMA :

Malign melanom son yıllarda, ensidansında belirgin artış görülen bir malignansidir. Multipli genetik değişiklikler nedeniyle malign melanom oluşumu ve tümör gelişimi meydana gelmektedir. Bu çalışmada, malign melanom oluşumuna neden olabilecek genetik değişikliklerin saptanması amaçlanmıştır. Bu nedenle de melanositik nevüs, displastik nevüs ve malign melanom örneklerinde sitogenetik ve moleküler genetik düzeyde araştırmalar yapılmıştır.

Benign, premalign ve malign melanositik oluşumlarda sitogenetik ve moleküler genetik yöntemlerle yapılan çalışmalarda gerek nevüslerde gerekse melanomlarda, 1, 6, 7, 9 ve 11 no'lu kromozomları içeren sayısal ve yapısal anomalilere rastlanmıştır. Sonuçlar, çalışma gruplarına göre farklılık göstermektedir (15,26). Malign melanomda, çoğunlukla 1p, 6q, 9p, 10q ve 11q bölgelerinde LOH saptanması nedeniyle bu bölgelerdeki çalışmalar yoğunlaşmıştır (74). Bu çalışmada sitogenetik düzeyde 2, 7, 11, ve 12 no'lu kromozomlarda anomali saptandı. Moleküler genetik çalışmada ise, dört farklı mikrosatellit bölgesine spesifik marker kullanılarak, üç farklı grup lezyonda mikrosatellit instabilitesine bakıldı. Bu markerlerden D2S123, 2. kromozomun kısa kolunda, hMSH2 geninin (mismatch tamir geni) yakınında bulunması nedeniyle; D11S29 markeri, 11.kromozomun kısa kolunda bulunan malign melanom oluşumunda etkili olabileceği düşünülen bir tümör supresör gen bulunduğu şüphesiyle; D14S65 ve BAT 40 markerleri ise, çeşitli solid tümörlerde çalışılmış genetik değişiklik saptanmış, ancak malign melanomda çalışılmamış markerler olmaları nedeniyle seçilmiştir.

Malign melanomlu dokuz vakanın ikisinde, sitogenetik düzeyde, klonal anomali saptandı. Çalışılan beş melanositik nevüste ise hiç bir kromozomal anomaliye rastlanmadı. Malign melanom örneklerinin ikisinde (ST-96-0012 ve ST-96-0041) primer hücre kültüründe üreme olmadı. ST-96-0041 nolu vakanın sol ön kolundan alınan doku, nekrotik görünümlüydü, ST-96-0012 no'lu vakanın sol bacak anterior bölgesinden alınan dokunun ise, ürememe nedeni bilinmemektedir. Dokunun nekrotik olması, operasyon öncesinde hastanın yüksek dozda antibiyotik veya hücre proliferasyonunu etkileyen başka bir ilaç almış olması, tedavi aşamasında kullandığı antimitotikler, hastanın yaşı, hücrelerin kültürde üremelerini etkileyen faktörlerdir. Laboratuvara gelen dokunun, bir saatten fazla + 4°C'de bekletilmesi, kullanılan hücre kültürü ortamının sıcaklığı, içeriği, inkübasyon sıcaklığı, vb. faktörler de in vitro üreme koşullarını etkileyebilmektedir. İntradermal nevüslerden birinde de (ST-96-0029) üreme olmamıştır. Bu nevüsün, yukarıda belirtilen faktörlere dikkat edildiği halde ürememe nedeni bilinmemektedir. Literatürden edinilen verilere göre , gerek primer malign melanomda gerekse metastatik melanomda sıklıkla klonal anomalilere rastlanmaktadır(93). Sonuçlarımızı, bu konu ile ilgili yayınlarla karşılaştırdığımızda, malign melanom örneklerinde literatürdekinden daha az klonal

anomali saptayabildiğimizi gördük. Eksizyon materyalinin, tümör orijininin alınmış olması sitogenetik verilerin yorumlanabilmesi açısından önemlidir ve klonal anomali saptama şansını yükseltir. Laboratuvara gelen eksizyon materyalinde; tümör hücreleri, normal hücrelerle mozaik halde bulunmaktadır. Makroskopik olarak ne kadar ayırdedilmeye çalışılsa da iki farklı hücreyi birbirinden ayırmak mümkün değildir. Bu nedenle hem tümör hücreleri, hem de normal hücreler birlikte kültüre alınmaktadır. Ortama hangi hücre uyum gösterirse ve ürerse, kültüre o hücreler hakim olmaktadır. Ancak iki hücre tipinin aynı anda üremesi de mümkündür.

Malign melanom vakalarında, 1, 6, 7, 9 ve 11 nci kromozomlarda sıklıkla anomaliye rastlanmakta olduğunu belirten yayınlar vardır (2). ST-96-0040 no'lu vakada iki hücrede 46, XX t (7;12) (q22;q24), t (2;11) (p25;q22) translokasyonları belirlendi. ST-96-0001 no'lu vakada ise üç hücrede 47, XX + marker kromozomu görüldü. Bu anomaliler, kromozomların kırılma bölgeleri yönünden daha önceden yayınlanmış çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (93). ST-96-0040 no'lu vakada görülen 2p ve 11q translokasyon bölgelerinin, MIN ve LOH çalışmalarında önemli görülen bölgeler oluşu, dikkat edilmesi gereken bir noktadır. Çalışmamızda 11q ile ilgili LOH ve MIN bulgularımız, sitogenetik veri ile uyumludur.

Diğer kanser türlerine yönelik yapılan çalışmalarda olduğu gibi, melanositik nevüslerde ve malign melanom üzerine yapılan çalışmalarda da moleküler düzeyde yapılan çalışmalara sitogenetik çalışmalar ışık tutmuştur. Yapısal anomali oluşumuna neden olan kırılma bölgeleri; tümör supresör genlerin inaktivasyonuna, onkogenlerin aktivasyonuna veya mismatch tamir genlerinde değişikliğe neden olabilmektedir. Tümör supresör genler, onkogenler ve mismatch tamir genleri, kanserle ilgili genlerin en az üç tipini oluşturmaktadır. Bu genlerde mutasyonların yoğunlaşması, çeşitli kanserlerin oluşumu ile ilişkilidir (96).

Bu çalışmada, sitogenetik analiz amacı ile kurulmuş olan primer hücre kültürlerinde, sekonder genetik değişim meydana gelebileceği düşünüldüğünden MIN analizi için kullanılmadı. Aynı vakaların parafin bloklarının ve uygun sahaların bulunamaması nedeniyle, farklı vakalarda parafin bloklardan DNA izolasyonu ve MIN analizine gidildi.

Melanositik nevüslerin, malign melanomlara dönüşümünde temel mekanizma bilinmemektedir. Çalışmamızda, dört farklı mikrosatellit markerinden yararlanılarak, benign melanositik lezyonlarda ve malign melanomun farklı evrelerinde MIN ve LOH araştırıldı. Örneklerin farklı mikrosatellit bölgelerinde, % 19 (4 / 21) oranında MIN, % 14 (3 / 21) oranında LOH saptandı. Displastik nevüslerden elde edilen sonuçlar dikkat çekicidir. 16 no'lu displastik nevüs vakasında D2S123 markerinde, D14S65 markerinde ve D11S29 markerlerinde MIN belirlenmiştir. Patolojik tanısı displastik nevüs olan 22 no'lu vakada da D2S123 bölgesinde LOH ve BAT40 bölgesinde MIN saptanmıştır. 16 no'lu vakanın malign melanom lezyonunda (T=Tümör) çalışılan markerler için instabilite veya LOH gözlenmedi. Premalign lezyonlarda, yakınındaki malign tümör dokusundakinden daha fazla ve çeşitli instabilite görülmesi Perucho'nun (47) açıkladığı "Mutasyona neden olan mutator" kavramına uyum

gösterir. Maligniteye dönüşme potansiyeli taşıyan dokuda, tamir genlerindeki mutasyon, bir çok farklı gen bölgesinde ve bu arada mikrosatellit dizilerde değişikliklere neden olacaktır. Ancak bu heterojen hücre popülasyonu içerisinde tek bir hücre klonal yayılım göstererek malign odağın ortaya çıkmasını sağlayacaktır. Bu konuda Shibata ve arkadaşlarının (97) kolon kanseri ve bitişindeki adenom dokusunda elde ettikleri veriler ile, Deng ve arkadaşlarının (98) meme kanserlerinde, malign odağın çevresindeki normal görünümlü dokuda LOH belirlemeleri gibi verilerle, bizim bulgularımız değer kazanmaktadır.

Melanoma patogeneğinde, 11. kromozomun kısa kolunda yerleşim gösteren bir tümör supresör gen olduğu düşünülmektedir (71,78,84).

Sitogenetik ve moleküler çalışmalarda meme, ovaryum, serviks ve akciğer gibi diğer solid tümörlerde ve malign melanom gelişimi sırasında 11. kromozomun uzun kolunda genetik değişikliklerin olduğu saptanmıştır (2,84). Tomlinson ve arkadaşları da (71), D11S29 (11q23.3) mikrosatellit bölgesinde % 38 oranında LOH saptamışlar ve bu bölgede melanom ve diğer birçok tümörün oluşumunda rol oynayan bir tümör supresör gen bulunabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, D11S29 bölgesinde bir vakada (Nodüler malign melanom- Level IV- 5 no'lu vaka) LOH, bir displastik nevüs vakasında da (16 no'lu vaka) MIN saptanmıştır. (% 18). Bu marker için sadece 11 vaka değerlendirilebilmiştir. Vaka sayısı artırıldığı takdirde oran değişebilecektir.

BAT40 mononükleotid tekrar markeri ile ailesinde malign melanom öyküsü olan displastik nevüslü bir vakada (22 no'lu vaka) BAT40 bölgesinde MIN saptandı. Bu vakada ailesel MM öyküsü olması ve BAT40 bölgesinde sadece bu vakada MIN görülmesi; bu bölgenin ailesel MM ile ilişkisi olabileceğini düşündürmektedir. Fakat bir örnekle böyle bir varsayımda bulunmak doğru olmaz.

D2S123 markeri, 2 no'lu kromozomun kısa kolunda, muhtemelen p15-16 bölgesinde, hMSH2 genine yakın bir yerde bulunmaktadır. Çalışmada genetik değişikliklerin çoğu, bu bölgede saptandı. 3 no'lu vakada (metastatik malign melanom) LOH, 16 no'lu vakanın displastik nevüsünde (DN) MIN, 22 no'lu vakada (Displastik nevüs) LOH gözlemlendi. Özellikle premalign bir lezyon olan displastik nevüs'te bu genetik değişikliklerin gözlenmesi; melanoma dönüşümde sinyal oluşturmaları bakımından son derece önemli bir bulgudur.

Tomlinson ve arkadaşları (71), 32 metastatik malign melanomun 11q23.3 bölgesinde LOH saptadılar. Bu çalışmada da metastatik malign melanom vakalarında (3 ve 5 no'lu vakalar) LOH saptanmıştır.

Konjenital nevüslerin malignansi riski oluşturduğu düşüncesinden yola çıkarak planlanan bu çalışmada, konjenital ve sonradan edinilmiş melanositik nevüslerin hiç birinde sitogenetik ve moleküler düzeyde bir anomaliye rastlanmadı. Ancak melanom öncülü olduğu bilinen displastik nevüslerde ve metastatik malign melanom örneklerinde genetik değişiklikler

saptandı. Displastik nevüste görülen mikrosatellit instabilitelerinin malignite sinyali oluşturduğu, metastatik melanomlarda da LOH kaybı meydana geldiği gözlemlendi. Bu arada malign melanom için önemli bölge olduğu düşünülen 11q23 lokusunda, tümör gelişimi evresinde genetik düzensizlikler görülmesi nedeniyle, malign melanom için önemli rol oynayan bir tümör supresör genin varlığı düşünülmektedir.

Mutatör fenotipli kanserlerde, daha az invaziv yöntemlerle erken tanı amacı ile, kan tükürük, idrar ve gaita gibi materyalden PCR'la MIN belirlenmesi mümkün olabilmektedir. Örneğin, Akciğer kanserli hastaların tükürüklerinde MIN saptanması sonucu; akciğer karsinogenezinin erken fazını belirlemede MIN tayini kullanılabilecektir (99).

Ailesel, erken yaşta ortaya çıkan kanserlerde mutator mekanizmanın rol oynadığına dair görüş yaygınlaşmıştır (47). Endometrial prekanserlerde (atipik endometrial hiperplaziler) saptanan RER+'lık de erken dönem endometrial neoplazmların belirleyicisidir (100).

MIN çalışmaları, bazı kanser türlerinde prognostik yaklaşımlarda da katkıda bulunmaktadır. Örneğin HNPCC'li MIN saptanan hastalarda iyi prognoz ve artan yaşam süresi görülürken, meme kanserinde MIN görülen vakalarda kötü prognoz ve azalan yaşam süresi gözlemlenmiştir (50,81). Mikrosatellit instabilitesi saptanan hücrelerin, bazı sitotoksik ajanlara direnç kazanması nedeniyle, MIN görülen malignansilerin, kemoterapötik hassasiyetinin yeniden değerlendirilmesi, tümörün genotipi dikkate alınarak daha etkili alternatif tedavi uygulanması gerekmektedir. Ancak ovaryum, akciğer, gastrik kanserler gibi diğer tümör tiplerinde MIN, prognoz açısından ilişkilendirilememiştir. MIN görülen malign melanomlu vakalarda da henüz prognostik bir ilişkilendirme yapılamamıştır. Bu nedenle, bu çalışma ve benzeri araştırmaların sonuçları, hastalarda süratle uygulanabilecek veriler sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR :

- 1- Green A, MacLannan R, Siskind V: Common acquired naevi and the risk of malignant melanom. *International Journal of Cancer*. 355:297-300,1985
- 2- Sandberg A A: The Chromosomes in human cancer and leukemia. Second edition, Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, 1990, 917-924
- 3- Kaplan E M, Nickoloff B J: Benign tumors and conditions of the skin and subcutaneous tissue. *Clinics in Plastic Surgery*. 14(2):277-300,1987
- 4- Happle R: What is a nevus? A proposed definition of a common medical term. *Dermatology*. 191(1):1-5,1995
- 5- Rhodes A R: Neoplasms: Benign neoplasias, hyperplasias and dysplasias of melanocytes. In: Fitzpatrick T B, Eisen A Z, Wolff K, Freedberg I M, Austen K F: *Dermatology in general medicine*. 4 th edition, McGraw-Hill Inc. USA,1993, 996-1077
- 6- Scriver C R, Beaudet A L, Sly W S, Valle D: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol. III, Seventh Edition, McGraw-Hill, 1995, Part 21,4353-4437
- 7- Hendricson M R, Ross J C: Neoplasms in congenital giant nevi. *Am J Surg Pathol*. 5:109-135,1981
- 8- Davis N C: Malignant melanoma. In: Emmett A J J, O'rourke M G E: *Malignant skin tumours*, Second edition, Churchill Livingstone Co. U.K, 1991, 71-108
- 9- Bataille V, Bishop J A N, Sasieni P, et al.: Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case - control study. *British Journal of Cancer*. 73:1605-1611,1996
- 10- Garbe C, Weib J, Krüger S, et al: The German melanom registry and environmental risk factors implied. *Recent Results in Cancer Research*, Springer- Verlag -Heidelberg. 128:69-89,1993
- 11- Herlyn M, Clark W H, Rodeck U, et al.: Biology of Disease: Biology of tumor progression in human melanocytes. *Laboratory Investigation*. 56(5):461-474,1987
- 12- Lober C W: Dysplastic (Atypica) Nevi: Significance and management. *Southern Medical Journal*. 85(9):870-877,1992
- 13- Friedman R J, Rigel D S, Kopf A W, et al.: *Cancer of the skin*. First edition, W.B. Saunders Co. USA, 1991, Chapter 9-11
- 14- Weiss J, Garbe C, Büttner P, Jung E G: Dysplastic nevi-Dysplastic nevus syndromes: Clinical features and genetic aspects, *Recent Results in Cancer Research*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. 128:101-118,1993
- 15- Cowan J M, Halaban R, Francke U: Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas. *J Natl Cancer Inst*. 80:1159-1164,1988

- 16- Levin D B, Wilson K, de Amorim G V, et al.: Detection of p53 mutations in benign and dysplastic nevi. *Cancer Research*. 55:4278-4282,1995
- 17- Bale S R, Dracopoli N C, Tucker M A, et al: Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma - dysplastic nevus to chromosome 1. *New England Journal of Medicine*. 320:1367-1372,1989
- 18- McDonagh A J C, Wright A L, Messenger A G: Dysplastic naevi in association with partial deletion of chromosome 11. *Clinical and Experimental Dermatology*. 15:44-45,1990
- 19- Kath R, Rodeck U, Menssen H D, et al.: Tumor progression in the human melanocytic system. *Anticancer Research*. 9:865:872,1989
- 20- Jung E G, Bohnert E, Boonen H: Dysplastic nevus syndrome: ultraviolet hypermutability confirmed in vitro by elevated sister chromatid exchanges. *Dermatologica*. 173:297-300,1986
- 21- Bergfeld W, Helwig W B: Exhibit at the Academy of Dermatology. December 1972
- 22- Rhodes A R, Melski J W: Small congenital nevocellular nevi and risk of cutaneous melanoma. *J Pediatr*. 100:219-224,1982
- 23- Illig L, Weidner F, Hundeiker M, et al: Congenital nevi ≤ 10 cm as precursors to melanoma. *Arch Dermatol*. 121:1274-1281,1985
- 24- Harnett P, Kefford R F: Molecular models of tumorigenesis: Application to familial and sporadic melanoma. *Seminars in oncology*. 15(6):549-557,1988
- 25- Mancianti M-L, Herlyn M: Tumor progression in melanoma: The biology of epidermal melanocytes in vitro. In:Conti C J, et al.: *Skin Tumors: Experimental and Clinical Aspects*, Raven Press, New York, 1989,369-386
- 26- Richmond A, Fine R, Murray D, Lawson D H, Priest J H: Growth Factor and Cytogenetic Abnormalities in cultured nevi and malignant melanomas. *J Invest Dermatol*. 86:295-302,1986
- 27- Porta G D, Pierotti M A : Malignant melanoma. In: Kurzrock R, Talpaz M: *Molecular biology in cancer medicine*, First edition, Martin Dunitz Ltd. London, 1995, 348-358
- 28- Herlyn M, Kath R, Williams N, et al.: Growth-regulatory factors for normal, premalignant, and malignant human cells in vitro. *Adv Cancer Res*. 54:213-234,1990
- 29- Halaban R, Ghosh S, Duray P, et al.: Human melanocytes cultured from nevi and melanomas. *J Invest Dermatol*. 87:95-101,1986
- 30- Rhodes A R: Increased intraepidermal melanocyte frequency and size in dysplastic melanocytic nevi, superficial spreading melanoma, nevocellular nevi and solar lentigines. *J Invest Dermatol*. 80:452-455,1983
- 31- Chaudhuri P K: Incidence of estrogen receptors in benign nevi and human malignant melanoma. *JAMA*. 244:791-795,1980

- 32- Barlogie B: Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *Am J Keo.* 69:195-197,1980
- 33- Peter E J, Wit D, Goos N P, et al.: Pathology of malignant melanom, including new markers and techniques in diagnosis and prognosis. *Current opinion in Oncology.* 8:143-151,1996
- 34- Fusaro R M, Lynch H T: Hereditary melanoma and dysplastic nevus syndrome. Recent results in cancer research, Springer Verlag Heidelberg. 128:94-100, 1993
- 35- Yasuda H, Kobayashi H, Ohkawara A, Kuzumaki N: Differential expression of ras oncogene products among the types of human melanomas and melanocytic nevi. *J Invest Dermatol.* 93:54-59,1989
- 36- Carr J, Mackie R M: Points mutations in the N-ras oncogene in malignant melanoma and congenital naevi. *British Journal of Dermatology.* 131:72-77,1994
- 37- Albino A P, Nanus D M, Mentle I R, et al.: Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: Correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene.* 4:1363-1374,1989
- 38- Traboulsi E I, Zimmermann L E, Manz H J: Cutaneous malignant melanoma in survivors of heritable retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* 106:1059-1061,1989
- 39- Piepkorn M W: Genetic basis of susceptibility to melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 31:1022-1039,1994
- 40- Dracopoli N C, Harnett P, Bale S J, et al.: Loss of alleles from the distal short arm of chromosome 1 occurs late in melanoma tumor progression. *Proc. Natl Acad Sci (USA).* 86:4614-4618,1989
- 41- Trent J M, Stanbridge E J, McBride H L, et al.: Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. *Science.* 247:568-571,1990
- 42- Walker G J, Nancarrow D J, Walters M K, et al.: Linkage analysis in familial melanoma kindreds to markers on chromosom 6p. *Int. J. Cancer.* 59:771-775,1994
- 43- Ray M E, Su Y A, Meltzer P S, Trent J M: Isolation and characterization of genes associated with chromosome 6 mediated tumor suppression in human malignant melanoma. *Oncogene.* 12:2527-2533,1996
- 44- Thompson F H, Emerson J, Olson S, Weinstein R, et al.: Cytogenetics of 158 patients with regional or disseminated melanom. *Cancer Genet Cytogenet.* 83:93-104, 1995
- 45- Strachan T, Read A P: Human Molecular Genetic, First edition, Bios Scientific Publisher Ltd., 1996, Oxford, U.K
- 46- Quinn A G, Healy E, Rehman I, et al.: Microsatellite instability in human non-melanoma and melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol.* 104(3):309-312,1995
- 47- Perucho M: Microsatellite instability: The mutator that mutates the other mutator. *Nature Medicine.* 2 (6):630-631,1996

- 48- Marra G, Boland C R: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: The syndrome, the genes and historical perspectives. *Journal of the National Cancer Institute*. 87(15):1114-1125,1995
- 49- Ionov Y, Peinado M A, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 363:558-561,1993
- 50- Thibodeau S N, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 260:816-819,1993
- 51- Shibata D, Navidi W, Salovaara R, et al.: Somatic microsatellite mutations as molecular tumor clocks. *Nature Medicine*. 2(6):676-681,1996
- 52- Sidransky D: Molecular markers in cancer diagnosis. *J Natl Cancer Institute Monogr*. 17:27-29,1995
- 53- Jiricny J: Colon cancer and DNA repair: have mismatches met their match? *TIG*. 10(5):164-168,1994
- 54- Peltomaki P, Aaltonen L A, Sistonen P et al.: Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science*. 260:810-812,1993
- 55- Fishel R A, Kolodner R: An *Escherichia coli* cell-free system that catalyzes the repair of symmetrically methylated heteroduplex DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 49:603-609,1984
- 56- Leach F S, Nicolaides N C, Papadopoulos N, et al.: Mutations of mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*. 75:1215-1225,1993
- 57- Brentnall T A: Microsatellite instability: Shifting concepts in tumorigenesis. *American Journal of Pathology*. 147 (3):561-563,1995
- 58- Papadopoulos N, Nicolaides N C, Wei Y F, et al.: Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*. 263:1625-1629,1994
- 59- Nicolaides N C, Papadopoulos N, Liu B, et al.: Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*. 371:75-80,1994
- 60- Johnston P G, Allegra C J: Colorectal cancer biology: Clinical implications. *Seminars in Oncology*. 22(5):418-432,1995
- 61- Aaltonen, L A, Peltomaki P, Leach F S, et al.: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 260:812-816,1993
- 62- Mao L, Lee D J, Tockman M S, et al.: Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*. 91:9871-9875,1994
- 63- Wooster R, Cleton-Jansen A M, Collins N, et al.: Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nature Genetics*. 6:152-156,1994

- 64- Peinado M A, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M: Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc.Natl. Acad. Sci (USA)*. 89:10065-10069,1992
- 65- Fong K M, Zimmerman P V, Smith P J: Microsatellite instability and other molecular abnormalities in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*. 54:2098-2101,1995
- 66- Chong J M, Fukayama M, Hayashi Y, et al.: Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Research*. 54:4595-4597,1994
- 67- Walker G J, Palmer J M, Walters M K, et al.: Simple tandem repeat allelic deletions confirm the preferential loss of distal chromosome 6q in melanoma. *Int J Cancer*. 58:203-206,1994
- 68- Boland C R: Setting microsatellites free. *Nature Medicine*. 2(9):972-974,1996
- 69- Keller G, Rotter M, Vogelsang H, et al.: Microsatellite instability in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract: relation to clinicopathological data and family history. *Am J Pathol*. 147:593-600,1995
- 70- Larson R S, Scott M A, McCurley T L, Vnencak-Jones C L: Microsatellite analysis of posttransplant lymphoproliferative disorders: Determination of donor/recipient origin and identification of putative lymphomagenic mechanism. *Cancer Research*. 56:4378-4381,1996
- 71- Tomlinson I P M, Beck N E, Bodmer W F: Allele loss on chromosome 11q and microsatellite instability in malignant melanoma. *Eur J Cancer*. 32A(10):1797-1802,1996
- 72- Vogelstein B, Fearon E R, Kern S E, et al.: Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*. 244:207-211,1989
- 73- Anthoney D A, McIlwrath A J, Gallagher W M, et al.: Microsatellite instability, apoptosis and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells. *Cancer Research*. 56:1374-1381,1996
- 74- Healy E, Belgaid C E, Takata M, et al.: Allelotypes of primary cutaneous melanoma and benign melanocytic nevi. *Cancer Research*. 56:589-593,1996
- 75- Weaver-Feldhaus J, Gruis N A, Neuhausen S, et al.: Localization of a putative tumor suppressor gene by using homomzygous deletions in melanomas. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*. 91:7563-7567,1994
- 76- Peris K, Keller G, Chimenti S, et al.: Microsatellite instability and loss of heterozygosity in melanoma. *J Invest Dermatol*. 105(4):625-628,1995
- 77- Schwartz H S, Talwalkar V R, Hedges L K, Butler M G: Microsatellite instability in malignant melanoma. Vanderbilt University, Nashville, T N. (Poster). The American Society of Human Genetics - 46 th Annual Meeting - Oct.29 - Nov.2, 1996
- 78- Herbst R A, Larson A, Weiss J, et al.: A Defined region of loss of heterozygosity at 11q23 in cutaneous malignant melanoma. *Cancer Research*. 55:2494-2496,1995

- 79- Wainwright B: Familial melanoma and p16-a hung jury. *Nature Genetics*. 8:3-5,1994
- 80- Hussussian C J, Struewing J P, Goldstein A M, et al.: Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature Genetics*. 8:15-21,1994
- 81- Paulson T G, Wright F A, Parker B A, et al.: Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Research*. 56:4021-4026,1996
- 82- Walker G J, Palmer J M, Walter M K, et al.: A genetic model of melanoma tumorigenesis based on allelic losses. *Genes Chrom Cancer* 12:134-141,1995
- 83- Chung Y-J, Song J-M, Lee J-Y, et al.: Microsatellite instability-associated mutations associate preferentially with the intestinal type of primary gastric carcinomas in a high-risk population. *Cancer Research*. 56:4662-4665,1996
- 84- Robertson G, Coleman A, Lugo T G: A malignant melanoma tumor suppressor on human chromosome 11. *Cancer Research*. 56:4487-4492,1996
- 85- Limon J, Cin D P, Sandberg A A: Application of long-term collagenase disaggregation for the cytogenetic analysis of human solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet*. 23:305-313,1986
- 86- Mitelman F: *ISCN 1995-An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, 1995, S.Karger Publishers, Basel
- 87- Foursthoefel K F, Papp A C, Synder P J, Prior T W: Optimization of DNA extraction from formalin, fixed tissue and its clinical application in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Clin Pathol*. 98:98-104,1992
- 88- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T: *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, E3-E4,1989
- 89- Parsons R, Myeroff L L, Liu B, et al.: Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Research*. 55:5548-5550,1995
- 90- Ishimaru G, Adachi J-I, Shiseki M, et al.: Microsatellite instability in primary and metastatic colorectal cancers. *Int J Cancer Pred. Oncol*. 64:153-157,1995
- 91- Yang D, Waldman A S: Isolation and cloning of DNA amplification products from silver-stained polyacrilamid gels. *Biotechniques*. 2(16):226-227,1994
- 92- C-Anolless G, Gresshoff P M: Staining with Silver. *Promega notes magazine* 45:13-18,1994
- 93- Felix Mitelman: *Catalog of chromosome aberrations in cancer*. Fourth edition, Wiley-Liss, 1991, USA
- 94- Chen X Q, Stroun M, Magnenat J L, et al.: Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nature Medicine*. 2(9):1033-1035,1996

- 95- Nawroz H, Koch W, Anker P, et al.: Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nature Medicine*. 2(9):1035-1037,1996
- 96- Tangir J, Loughridge N S, Berkowitz R S et al.: Frequent microsatellite instability in epithelial borderline ovarian tumors. *Cancer Research*. 56:2501-2505,1996
- 97- Shibata D, Peinada M A, Ionov Y, et al.: Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nature Genet*. 6:273-281,1994
- 98- Deng G, Lu Y, Zlotnikov G, et al.: Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science*. 274:2057-2059,1996
- 99- Miozzo M, Sozzi G, Musso K, et al.: Microsatellite alterations in bronchial and sputum specimens of lung cancer patients. *Cancer Research*. 56:2285-2288,1996
- 100- Mutter G L, Boynton K A, Faquin W C, et al.: Allelotype mapping of unstable microsatellites establishes direct lineage continuity between endometrial precancers and cancer. *Cancer Research*. 56:4483-4486,1996



T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU