T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Ufuk USTA

NORMAL PROSTAT, YÜKSEK DERECELİ PROSTATİK İNTRAEPİTELYAL NEOPLAZİ VE PROSTAT ADENOKARSİNOMUNDA BRCA1, BRCA2 VE CHEK2 PROTEİN EKPRESYONLARININ İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRMESİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Tufan ÇİFTÇİ

EDİRNE-2012

TEŞEKKÜR

Mesleki görgü, bilgi ve becerilerimi kazanmamda büyük paya sahip olan sayın hocam Doç. Dr. Ufuk Usta' ya, eğitimim sırasında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Kemal Kutlu, Prof. Dr. Filiz Özyılmaz, Doç. Dr. Şemsi Altaner, Doç. Dr. Ömer Yalçın, Yrd. Doç. Dr. Fulya Öz Puyan, Yrd. Doç. Dr. Tülin Yalta, Yrd. Doç. Dr. Ebru Taştekin, Yrd. Doç. Dr. Nuray Can, Uzm. Dr. Arzu Çalık' a, istatistiksel değerlendirme aşamasında yardımcı olan Doç. Dr. Necdet Süt' e, tezin immunohistokimyasal çalışmalarını yürüten Yük. Biolog Muzaffer Tudan' a ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **EMBRİYOLOJİ** 3
- **ANATOMİ** 3
- **HİSTOLOJİ** 4
- **PROSTAT BEZİNİN FONKSİYONU** 4
- **PROSTAT KANSERİ** 5
- **MODİFİYE GLEASON SKORLAMA SİSTEMİ** 7
- **ETYOLOJİ** 8
- **GENETİK MEKANİZMALAR VE PATOGENEZ** 9
- **TÜMÖR BASKILAYICI GENLER** 10
- **ONKOGENLER VE BÜYÜMEYİ DESTEKLEYEN GENLER** 10
- **"BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY" GENLERİ** 11
- **"CHECK POINT KINASE 2 GENE"** 14
- **PROSTATİK İNTRAEPİTELYAL NEOPLAZİ** 16

GEREÇ VE YÖNTEMLER 17

BULGULAR 20

TARTIŞMA 35

SONUÇLAR 41

ÖZET 43

SUMMARY 45

KAYNAKLAR 47

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

AATF : Apoptosis Antagonising Transcription Factor
AMACR : Alpha-methylacyl-CoA Racemase
ATM : Ataxia Telengiectasia Mutated
BASC : BRCA1-Associated Genome Surveillance Complex
BRCA1 : Breast Cancer Susceptibility gene 1
BRCA2 : Breast Cancer Susceptibility gene 2
CDC25A : Cell Division Cycle 25 homologue A gene
CDC25C : Cell Division Cycle 25 homologue C gene
CDK : Cyclin Dependent Kinase
CHEK2 : Check Point Kinase 2 gene
C-myc : C-myelocytomatosis gene
DNA : Deoxyribonucleic Acid
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
FOXM1 : Forkhead Box M1
GSTP1 : Glutathione S-tranferase gene
HGPIN : High Grade Prostatic Intraepitelial Neoplasia
MDM2 : Mousedouble Minute 2 homolog
MRN(complex) : Mre 11, RAD50, NBS1 complex
NBS1 : Nijmegen Breakage Syndrome gene
NKX3.1 : Prostate spesific gene
PIN : Prostatic Intraepitelial Neoplasia

PSA	**:** Prostate Spesific Antigen
PSCA	**:** Prostate Stem Cell Antigen
PTEN	**:** Phosphatase and Tensin Homologue
RNA	**:** Ribonucleic Acid
XRCC1	**:** X-ray Repair Cross Complementing Protein 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri dünyada altıncı en sık kanserdir ve erkeklerde en sık görülen kanser olarak kaydedilmiştir (1,2). Her yıl 320.000 yeni olgu tespit edilmekte, yaklaşık olarak da 42.000 olgu bu hastalığa bağlı olarak hayatlarını kaybetmektedir (3,4). Tespit edilen prostat kanseri vakalarının %75'i 65 ve üzeri yaşlardadır (3,5). Adenokarsinom bu vakaların %95'ini oluşturur (6).

Yüksek dereceli prostatik intraepitelyal neoplazi (HGPIN) kanserdeki fenotipik, biyokimyasal ve genetik değişiklikleri kapsayan ancak fibrovasküler stroma invazyonu göstermeyen karsinogenezisin kabul edilen erken evresidir (6-8). Yakın zamanda Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) prostatik intraepitelyal neoplazinin (PIN) prostat kanserinde tek preinvaziv lezyon olduğunu kabul etmiştir (1,6).

Prostat kanserinin etyopatogenezinde endojen ve ekzojen faktörler mevcuttur. Aile hikayesi, hormonlar, ırk, yaş ve oksidatif stres bazı endojen faktörlerdir (6). Ekzojen faktörlerin başında ise beslenme özellikleri gelir (1). Genetik olarak bakarsak; olası bir mekanizma spontan mutasyonların sonucunda onkogenlerdeki aktivasyon ve tümör supresor genlerdeki inaktivasyona bağlı durmayan hücre bölünmesidir. Diğer olası bir mekanizma ise diyetle alınan karsinojen maddelerin prostat dokusunda mutasyona yol açmasıdır (6).

Son yıllarda prostat karsinogenezini açıklamak adına çok sayıda genetik destekli çalışma yapılmıştır. "Breast Cancer Susceptibility gene 1" **(**BRCA1) ve "Breast Cancer Susceptibility gene 2" (BRCA2) özellikle meme tümörlerinde etkisi kanıtlanmış bir grup tümör baskılayıcı gen olarak prostat karsinomunda da birtakım çalışmalara konu olmuştur. Bununla birlikte "Check Point Kinase 2 gene" (CHEK2) de adı geçen genlerle birlikte

çalışan bir gendir ve prostat tümörlerindeki mutasyonu sınırlı sayıda çalışmada bulunmuştur (9,10). Bu bağlamda biz bu çalışmada BRCA1 ve BRCA2 ile CHEK2'nin prostat karsinogenezindeki rollerini ve birbirleriyle bu yöndeki ilişkilerini incelemeye çalışacağız.

GENEL BİLGİLER

EMBRİYOLOJİ

Prostat fetal gelişimin üçüncü ayı süresince ilk kez görülür ve ürogenital sinüsten gelişimine başlar. Gelişim dihidrotestosteron tarafından yürütülür. Beş epitelyumyal tomurcuk, veromontanumun her iki yanında ürogenital sinüsün arka tarafında iki yoldan şekillenir ve bunlar sonradan prostatı şekillendirmek üzere mezenkime hareket ederler (11,12).

Alt tomurcuklar endodermal orjinli görünen prostatın dış zonunu şekillendirirken, üst iki tomurcuk iç zonunu şekillendirir. Her iki prostat zonu, üretra etrafında konsantrik daireler şeklinde gelişir. Merkezi kısımda bulunan ejekülatör duktuslar ve etrafındaki mezenkimal doku mezonefrik kanal (Wollfian duktus) kökenlidir. Bundan dolayı prostat çift embriyonik orjine sahiptir (11,13).

ANATOMİ

Prostat mesane boynu ile ürogenital diafram arasında gerçek pelviste yer almaktadır. Üretranın pars prostatika bölümünün çevresinde yer alan prostat glandının *basis prostatae* adı verilen tabanı yukarıda, mesanenin arka alt yüzü altında*; apeks prostatae* adı verilen kısmı aşağıda diafragma ürogenitalenin üst yüzeyinde yer almaktadır. Ön yüzü simfizis pubisin arkasında, arka yüzü rektumun önünde bulunmaktadır (14,15).

Prostat anatomik olarak isthmus, sağ, sol ve medial lob olarak 4 bölüme ayrılır (16,17). McNeal'in geliştirdiği sınıflandırmaya göre 3 farklı zondan oluşmaktadır (18).

Periferik zon: Prostat hacminin %70 kadarını oluşturur. Prostatik intraepitelyal neoplazi ve karsinomun en sık görüldüğü bölgedir. Glandlar basit yapıda ve küçük yuvarlak şekillidir.

Santral zon: Prostat hacminin %25 kadarını oluşturur. *Basis prostatae* ve ejakülatör duktus çevresini içerir. Glandlar büyük ve kompleks yapıda olma eğilimindedir. Epitelyum/stroma oranı diğer zonlara göre daha yüksektir.

Transizyonel zon: Prostatik üretra çevresindeki kısımdır. Prostat hacminin %5 kadarını oluşturur. Glandlar basit yapıda ve küçük çapta olma eğilimindedir. Periferik zondan farkı daha kompakt bir stromaya sahip olmasıdır.

Prostatın arterleri başlıca *arteria iliaka internanın* dalları olan *arteria vezikalis inferior* ve *arteria rektalis mediadır*. Prostattan çıkan venler *pleksus prostatikus* adı verilen ağı oluşturur. Bu pleksus *vena iiliaka internaya* drene olur ancak *pleksus vezikalis* ve *pleksus vertebralis* ile de bağlantısı vardır. Lenf drenajı başlıca internal iliak , sakral ve ekternal iliak lenf nodlarına olur (17).

HİSTOLOJİ

Epitelyal ve stromal hücrelerden oluşmaktadır. Epitelyal hücreler prostatik üretraya açılan, primer duktuslarla başlayan, asinuslarla sonlanan yapıları döşemektedir. Prostatın epitelyum hücreleri ürotelyal hücreler, sekretuar hücreler, bazal hücreler ve nöroendokrin hücrelerden oluşmaktadır. Stromal hücreler, çizgili ve düz kas hücreleri , fibroblastlar, nöral ve endotelyal hücreleri içermektedir (18).

PROSTAT BEZİNİN FONKSİYONU

Prostat bezi sitrat iyonları, kalsiyum, fosfat iyonları, bir pıhtılaşma enzimi ve fibrinolizin içeren ince, süte benzer bir sıvı salgılar. Emisyon sırasında prostat bezinin kapsülü, vasa deferensle eş zamanlı olarak kasılırlar. Böylece ince, sütümsü prostat sıvısı, semen kitlesine eklenir. Prostat sıvısının hafif alkalik özelliği, ovumun başarılı şekilde döllenmesi için çok önemli kabul edilir çünkü, vasa deferens sıvısı spermin metabolik ürünleri ve sitrik asit varlığında, göreceli olarak asidik özelliktedir. Bu asidik ortam nedeniyle spermin fertilite özelliği baskılanabilir. Ayrıca kadının vajinal salgıları da asidiktir (pH 3,5-4,0). Sperm ortam pH'sı 6,0 ila 6,5'e ulaşana kadar optimal hareketliliğini

göstermez. Sonuç olarak, prostat sıvısının, diğer ejekülat sıvılarının asiditesini nötralize etmesi ve bu yolla spermin hareket ve fertilizasyon yeteneğinin artması olasıdır (3,20).

PROSTAT KANSERİ

Prostat kanseri erkeklerde en sık görülen tümördür. Prostat karsinomlarının %95' inden fazlasını değişen derecelerde farklılaşma gösteren asiner adenokarsinomlar oluşturur (11,21).

Prostat Tümörlerinin Histolojik Sınıflandırması

I.Epitelyal tümörler

A.Glandüler neoplazmlar

1.Asiner adenokarsinom

-Atrofik

-Pseudohiperplastik

-Köpüksü

-Kolloid

-Taşlı yüzük hücreli

-Onkositik

-Lenfoepitelyoma benzeri

2.Sarkomatoid diferansiasyonlu karsinom (karsinosarkom)

3.Prostatik intraepitelyal neoplazi(PIN)

-Prostatik intraepitelyal neoplazi, grade III (PIN III)

4.Duktal adenokarsinom

-Kribriform

-Papiller

-Solid

B.Ürotelyal karsinom

C.Skuamöz tümörler

1.Adenoskuamöz karsinom

2.Skuamöz hücreli karsinom

D.Bazal hücreli tümörler

1.Bazal hücreli adenom

2.Bazal hücreli karsinom

II.Nöroendokrin tümörler

1.Nöroendokrin diferansiasyon gösteren adenokarsinom

2.Karsinoid tümör

3.Küçük hücreli karsinom

4.Paraganglioma

5.Nöroblastom

III.Prostatik stromal tümörler

1.Malignite potansiyeli bilinmeyen stromal tümör

2.Stromal sarkom

IV.Mezenkimal tümörler

1.Leiomyosarkom

2.Rabdomyosarkom

3.Kondrosarkom

4.Anjiosarkom

5.Malign fibröz histiositom

6.Malign periferik sinir kılıfı tümörü

7.Hemanjiom

8.Kondrom

9.Leiomyom

10.Granüler hücreli tümör

11.Hemanjioperisitom

12.Soliter fibröz tümör

V.Hematolenfoid tümörler

1.Lenfoma

2.Lösemi

VI.Diğer tümörler

1.Kistadenom

2.Nefroblastom

3.Rabdoid tümör

4.Germ hücreli tümörler

-Yolk sac tümörü

-Seminom

-Embriyonal karsinom

-Koryokarsinom

5.Berrak hücreli adenokarsinom

6.Melanom

VII.Metastatik tümörler

MODİFİYE GLEASON SKORLAMA SİSTEMİ

Patern 1

Oval veya yuvarlak, orta çaplı, uniform glandların sıkıca paketlendiği çevre prostat dokusunu infiltre etmeyen düzgün sınırlı nodül şeklindedir. Hücre sitoplazmaları genellikle geniş ve açık eozinofilik renklidir.

Patern 2

Patern 1'e benzer ancak glandlar daha gevşek dağılım gösterir ve 1' deki kadar uniformite yoktur, nodül çevresinde minimal infiltrasyon olabilir.

Patern 3

Birbirinden bağımsız glandüler yapılar, Gleason patern 1 ve 2'dekinden tipik olarak daha küçük glandlar, nonneoplastik prostatik asinuslara infiltrasyon, çap ve şekilde belirgin değişkenlik ve düzgün sınırlı küçük kribriform nodüller mevcuttur.

Patern 4

Birleşmiş mikroasiner glandlar, düzgün lümen oluşturamayan sınırları düzensiz glandlar, irregüler şekilli kribriform glandlar ve hipernefroid yapı mevcuttur. Düzgün lümen oluşturmayan çok küçük çaplı ve düzensiz sınırlı glandüler yapılar klasik Gleason derecelendirme sisteminde patern 3 altında incelenirken ISUP (International Society of Urological Pathology) konsensus konferansında patern 4 içine dahil edilmiştir.

Patern 5

Glandüler diferansiasyon yoktur, solid adalar, kordlar veya tek hücreler; papiller, kribriform veya solid adaların çevrelediği santral nekroz içeren komedokarsinom vardır (16,22).

ETYOLOJİ

Risk faktörleri eksojen ve endojen olarak sınıflanabilir. Eksojen faktörler olarak çevresel etkenler ve kirlilik kabul edilebilir. Endojen faktörler ise aile hikayesi, hormonlar, ırk, yaş ve oksidatif stres sayılabilir (9,18).

Aile Hikayesi

Epidemiyolojik çalışmalarda aile hikayesinin prostat kanseri ile belirgin ilişkisi saptanmıştır. Babası veya kardeşi gibi birinci derece akrabasında prostatik adenokarsinom olan birinde risk 2 kat iken iki ya da üç birinci derece akrabasında prostat adenokarsinomu olan birinde risk 5 ile 11 kat arası olur (1).

Hormonlar

Erkek seks hormonları prostat kanseri gelişiminde önemli rol oynar (1, 23). Androjenler prostat kanseri büyüme oranını belirgin olarak artırır ve androjen metabolizmasının arttığı durumlarda da tümör progresyonu preklinik durumdan klinik olarak belirgin kansere dönüşebilir (6).

Irk

Irksal farklılıklar üç faktörden etkilenir; bunlar kirlilik durumundaki farklılıklar, hastalığı belirleme durmundaki farklılıklar ve biyolojik farklılıklar (6).

Oksidatif Stres

Prostat kanseri teorik olarak oksidatif stresteki artışa bağlı gelişebilir ancak bu konuda destekleyici çalışma sayısı azdır (6). Klinik çalışmalar selenyum, alfa-tokoferol (vitamin E) ve likopen (bir karotenoid) alımının prostat kanserine karşı koruyucu olduğunu göstermektedir (1).

Diyet

Bu alanda prostat kanseri gelişiminde tanımlayıcı epidemiyolojik çalışmalarla birçok faktör tanımlanıştır. Yağ ve özellikle poliansatüre yağ tüketimi prostat kanseri insidansı ve mortalitesiyle pozitif korelasyon göstermektedir. Bunun dışında yağ metabolizmasındaki bozulmalar da sebepler arasındadır (6).

Mesleki Faktörler

Birçok mesleki ve endüstriyel kirlilik ve birikim etkenleri prostat kanseri riski açısından değerlendirilmiş ancak net sonuçlara varılamamıştır. Tarım ve lastik endüstrisi bunlardan en belirgin olanlarıdır (6).

GENETİK MEKANİZMALAR VE PATOGENEZ

Yüksek dereceli prostatik intraepitelyal neoplazi ve prostat karsinomunda benzer genetik değişiklikler görülmektedir (6). Her ikisinde de diğer kanserlerdekine benzer şekilde, birçok somatik genetik değişiklik mevcuttur. Bazı somatik değişiklikler genetik olup, nokta mutasyonları, delesyonlar, amplifikasyonlar ve translokasyonlar şeklindedir. Diğer değişiklikler epigenetik olup, en önemlileri deoksiribonükleik asit (DNA) metilasyonu ve histon modifikasyonundaki değişikliklerdir (24-26).

Somatik Epigenetik Değişiklikler

Prostat kanserlerinde oldukça sık rastlanan somatik epigenetik değişiklik olan "Glutathione S-Transferaz" (GST ya da GSTP1) genlerinin kodladığı GST enzimleri, oksidan maddelerin detoksifikasyonundan sorumludurlar. GSTP1 eksikliği veya yokluğu prostat karinomunda ve PIN' da erken saptanan genetik değişikliklerden birisini oluşturmaktadır (24-26).

Somatik Genetik Değişiklikler

Prostat kanserlerinde kromozomal ve subkromozomal düzeyde genetik değişiklikler görülmektedir. Bu kromozomal değişiklikler 8p, 10q, 13q, 16q kromozomlarında kayıp, 22q kromozomunda yeniden düzenleme ve 7p, 7q, 8q ve Xq'da rekürren gen kazanımları şeklindedir (25, 26).

Telomer Kısalması

Telomerler kromozomların bütünlüğünü ve stabilitesini sağlar. Telomer kısalması erken prostat kanserinde görülen ve hastalığın ilerlemesine yol açan kromozomal instabiliteye sebep olan bir özellik gibi görülmektedir (27).

TÜMÖR BASKILAYICI GENLER

NKX3.1 Geni

8p21.2 kromozomunda yerleşen birçok genden biri olan NKX3.1 proteini, prostata spesifik olup normal prostat gelişimi için gereklidir. 8p kromozomu delesyonu sonucu NKX3.1 protein ekpresyonu azalarak HGPIN ve prostat kanseri gelişmektedir (24,25).

"Phosphatase and Tensin Homolog" (PTEN) Geni

Kromozom 10q23'te lokalize tümör baskılayıcı gen PTEN, phosphatidylinositol 3'-kinase/protein kinase B sinyal yolağını inhibe ederek siklus progresyonunda ve surveyinde rol oynamaktadır (25).

"C-Myelocytomatosis Gene" (C-myc)

Bu protein, nükleer transkripsiyon faktörü olup hücre siklus progresyonu, protein sentezi ve mitokondriyal fonksiyonlarda rol oynamaktadır. Özellikle metastatik ve yüksek histolojik dereceli tümörlerde, c-myc geninin lokalize olduğu 8q24 kromozomunda amplifikasyon görülmektedir (25).

"Prostate Stem Cell Antigen" (PSCA)

8q kromozomunda lokalize PSCA proteini, benign prostat dokusunda bulunmakta ve PK'da amplifikasyon göstermektedir (24).

ONKOGENLER VE BÜYÜMEYİ DESTEKLEYEN GENLER

Androjen Reseptörü

Prostatın normal büyüme ve gelişim sürecinde androjenik hormonların kritik önemi bulunmaktadır (1). Androjen sinyali, ligand- bağımlı bir transkripsiyon faktörü olan androjen reseptörü aracılığıyla olmaktadır. HGPIN ve adenokarsinomlarda tümörü oluşturan hücrelerde, androjen reseptörü daha yüksek oranlarda eksprese edilmektedir (25).

"Alpha-methylacyl-CoA Racemase" (AMACR)

Mitokondriyal ve peroksizomal bir protein olup, dallanmış zincir yağ asidi türevlerinin β oksidasyonu ve safra asidi biosentezinde görevlidir. AMACR' ın kanser hücrelerinde aşırı ekspresyonu görülmektedir (1).

“BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY” GENLERİ

Kromozom 13q12’e BRCA1, 17q21’e , BRCA2 lokalizedir. BRCA1 geni 1863 a.a.’lik , BRCA2 geni ise 3418 a.a.’lik bir proteini kodlar. Her iki protein de hücrenin diğer bazı proteinleri ile bağlanarak işlev görür. BRCA1 ve BRCA2 genleri genom stabilizasyonu sağlayacak proteinler kodlarlar. Dolayısıyla bu genlerdeki mutasyonlar genomik instabiliteye neden olur. BRCA1 ve BRCA2 genleri genomik stabilitenin devam ettirilmesinde rol oynayan proteinler kodlar ve bu yönüyle tümör baskılayıcı gen gibi davranırlar (28,29). BRCA1 ve BRCA2 proteinlerinin hücre proliferasyonunun kontrolünde tümör baskılayıcı proteinler, DNA hasarına ve tamirine katılan proteinler, transkripsiyonun düzenlenmesinde rol alan proteinler, hücre siklusunun kontrol noktalarının önemli proteinleri ve DNA’da rekombinasyonda iş gören proteinler ile yakın ilişkileri gösterilmiştir. BRCA1 ve BRCA2’deki mutasyonlar ve BRCA proteinlerinin inaktivasyonu tümör baskılayıcı proteinlerin ve diğer “genom koruyucu” rolü olan proteinlerin de inaktivasyonuna neden olarak hücreyi tümör oluşumuna götürürler (28,30).

“Breast Cancer Susceptibility Gene 1”

“Breast cancer susceptibility gene 1” kromozom 17’nin uzun kolunda 21. bantta lokalize olup 1863 amino asitlik bir proteini kodlar. Çoğu çeşitli organda özellikle testis ve timusta fazla expresyonu gözlenir. BRCA1 geni , genomik stabilitenin devam ettirilmesinde rol oynayan nükleer bir fosfoproteini kodlar ve tümör baskılayıcı gen gibi davranır. Kodlanan bu protein , “BRCA1-Associated Genome Surveillance Complex” (BASC) olarak bilinen , farklı tümör baskılayıcı proteinleri, DNA hasar algılayıcıları ve sinyal iletim elemanları ile beraber çoklu-birimli BRCA1-ilişkili genom denetim birimini oluşturur. Bu genin ürünü ribonükleik asit (RNA) polimeraz II ile C-terminal bölgesi üzerinden bağlanır ve ayrıca histon deasetilaz kompleksi ile de etkileşime girer. Bu protein böylece transkripsiyonda, DNA çift iplik kırıklarında onarımı ve rekombinasyonda önemli roller oynar. Bu gendeki mutasyonlar yaklaşık kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık %40’ından, kalıtsal meme ve over kanserlerinin %80’ninden fazlasından sorumludur (28,31).

“Breast cancer susceptibility gene 1” fonksiyonu ve mekanizması: Deoksiribonükleik asit hasar tamiri: **“**Breast cencer susceptibility gene 1” proteini direkt olarak hasarlanmış DNA’nın tamirinden sorumludur. Çoğu çeşit normal hücrelerin

nükleuslarında BRCA1 ve Rad51'in DNA çift iplik kırıklarında etkileşim halinde olduğu düşünülmektedir. Bu tür kırıklar doğal radyasyon veya diğer mutajenik ajanlara maruziyetten kaynaklanacağı gibi kromozomlardaki genetik materyali değişimlerinin olduğu esnalarda da (çapraz geçiş, homolog rekombinasyon) gerçekleşebilir. Fonksiyonu BRCA1' inkine benzeyen BRCA2 proteini, Rad51 ile direk etkileşime girer. DNA hasar tamirinde rol oynayan bu üç protein genomik stabilitenin devamının sağlanmasında çok önemlidirler. BRCA1 direk olarak DNA' ya yüksek afinite ile bağlanır. Bu yeteneği ile DNA' ya bağlanması Mre 11, RAD50, NBS1 complex (MRN)' nin nükleaz aktivitesini baskılaması ile ilişkilendirilmiştir (28,32).

Rekombinasyonel onarım: Deoksiribonükleik asit onarımının bir başka biçimi olan rekombinasyonel onarım, hasarlı DNA'nın hasarsız bir moleküle rekombinasyonu temeline dayanır. Bu mekanizma DNA replikasyonu sırasında karşılaşılan ve normal replikatif DNA polimerazlarca kopyalanamayarak bir replikasyon çatalının ilerlemesini bloke eden , timin dimerlerinin veya çift DNA kırıklıklarının bulunduğu hasarların onarımında sıklıkla kullanılır (28,32).

Rekombinasyonel onarım, bir atasal DNA ipliğin onarımında kullanılacak olan normal bir yeni molekülün kopyalanmasını sağladığı durumda geçerlidir. Rekombinasyonel onarım iyonize radyasyon veya bazı kimyasallar ile oluşturulan çift iplik kırıklarının onarımı için de belli başlı mekanizmadır. Bu tip hasar her iki ipliği de etkilediği için, onarımı özellikle zordur. Hasarsız kromozom üzerindeki homolog DNA dizileri ile rekombinasyon, bu tip hasarların onarımına ve normal DNA dizisinin yerine konmasına olanak sağlar (28,32).

Alternatif olarak çift iplik kırıkları basitçe tek DNA molekülündeki kırık uçların yeniden birleştirilmesiyle onarılabilir, ancak hasar bölgesinin etrafındaki bazların kaybından dolayı hata sıklığı yükselir. Kalıtsal meme kanserinden sorumlu olan genlerin özellikle BRCA1 ve BRCA2'nin kodladığı proteinlerin homolog rekombinasyon ile çift iplik kırıkların onarımında görevli olmaları , bu DNA onarımındaki bozukluğun, kadınlarda en yaygın kanserlerden birisinin gelişimine yol açabileceğini göstermektedir (28,32).

"Breast cancer susceptibility gene 1" mutasyonları ve tümör histopatolojisi: "Breast cancer susceptibility gene 1" mutasyonlu hastalarda, epitelyal tümörler (karsinomlar) en sık verilen histolojik tanıdır. Malign transizyonel hücreli karsinom gibi çok ender görülenler de dahil olmak üzere malign epitelyal over neoplazmlarının tüm subtipleri rapor edilmiştir (28).

Bu mutasyonun endometrioid ve berrak hücreli karsinomlardaki sıklığı sporadik vakalarla aynıdır. Son veriler göstermektedir ki BRCA1/2 gen mutasyonları borderline neoplazmların gelişimine predispozisyon yaratmaz. Stromal tümörler ve malign germ hücreli neoplazmlar ise BRCA1/2 mutasyonları ile ilişkisiz görünmektedir. BRCA1 ovaryan kanserlerin çoğunluğu, eğer tanı anında over dışına yayılmış iseler kötü prognoza sahip seröz kistadenokarsinomlardır. BRCA1 taşıyıcılarında ortaya çıkan over kanserlerinin daha iyi prognoza sahip olduğunun rapor edildiği çalışmalar da vardır. BRCA1 gen mutasyonları, klinik olarak meme kanserli ailelerin % 15-20'sinde, meme-over kanserli ailelerin ise % 40-50'sinde saptanmıştır. Mutasyonlar tüm kodlama bölgesi boyunca oluşur ve dolayısıyla mutasyon spektrumunun gen fonksiyonuna göre rölatif olarak küçük olduğu düşünülür. Mutasyonların çoğunun, translasyondan sonra proteinlerin prematür kesilmesine neden olduğu tahmin edilir. Mutasyon taşıyıcılarında ortaya çıkan tümörlerde gözlenen "wild-type" allel kaybıyla bağlantılı olarak, tümörogenezde gen inaktivasyonunun önemli bir basamak olduğu sonucuna varılır (28).

Ailelerde saptanan mutasyonların güçlü değişkenliklerine rağmen belirli coğrafi ve etnik kökenlerde belirli mutasyonların çok sık saptandığı ortaya konmuştur. Sonuç olarak mutasyon spektrumu, örneklenen nüfusun etnik kökenine göre değişebilir (28).

"Breast Cancer Susceptibility Gene 2"

"Breast cancer susceptibility gene 2" kromozom 13q12'de lokalize olup , 3418 amino asitlik bir proteini kodlar. BRCA2 geni tümör baskılayıcı gen ailesine dahil olarak kabul edilmektedir ve genin kodladığı protein kromozomal hasarın tamirinde ve hücre siklusunun kontrolünde görev almaktadır.(28,33-34) BRCA2 geni çok geniş ve 8 adet BRC peptid motifi içeren 11. eksonu ile karakterizedir. BRC tekrar motifleri Rad51 ile etkileşimden sorumludurlar(28,35).

"Breast cancer susceptibility gene 1" in C-terminal ucunda ise tek dal DNA'ya bağlanma bölgesi bulunmaktadır. BRCA2 geni ürünü olan protein başka bir proteinle göze çarpan bir benzerlik göstermemektedir. 11. ekson tarafından kodlanan 8 adet BRC tekrarının birçok memeli türünde evrimsel olarak korunduğu gözlenmektedir ki bu da BRC tekrarlarının önemli bir görevi olduğu anlamına gelmektedir. Gerçekten de BRC tekrarları BRCA2'nin, DNA tamiri ve genetik rekombinasyondan sorumlu bir memeli proteini olan Rad51'le etkileşimini ve bağlanmasını düzenler. BRCA2 proteini, Rad51 ile etkileşimini iki

özel bölgesi üzerinden gerçekleştirir. Bu bölgelerden biri , BRCA2 geninin 11 eksonu tarafından kodlanan , 8 adet BRC aminoasit tekrarlarıdır (31).

Deoksiribonükleik asit hasarına yanıt olarak BRCA2 ve RAD51 tamir bölgesinde birbirleriyle birleşerek bir kompleks oluştururlar. BRCA2 proteininin bu işlem sırasında en önemli görevleri Rad51 ' in tamir bölgesine lokalizasyonunu sağlamak ve Rad51 'in tamir edilecek DNA ' ya bağlanmasını sağlamaktır. BRCA2 proteininden yoksun hücreler bu tamir yanıtını gerçekleştiremezler. (35,36).

"Breast cancer susceptibility gene 2" fonksiyonu ve mekanizması: Breast cancer susceptibility genlerinin yapıları birbirinden farklı olmasına rağmen fonksiyonları benzerdir. Bu iki genden kodlanan proteinler hasarlanmış DNA'nın tamirinde önemli rol oynarlar. BRCA2 proteini DNA kırıklarını tamir etmek için Rad51 adı verilen genin ürünü olan rekombinaz proteini ile birbirlerine bağlanırlar ve bu şekilde fonksiyon gösterirler (28,37). Aynı şekilde BRCA1 proteinide Rad51 proteiniyle bağlanır ve bu üç gen genomik stabilitenin devam ettirilmesinde kritik bir görevi yerine getirirler. Ayrıca BRCA1 gibi BRCA2' nin de embriyonel gelişimde diğer genlerin aktivitesinin düzenlediği düşünülmektedir (28,37).

"CHECK POINT KINASE 2 GENE"

"Check Point Kinase 2 gene" (CHEK2) insanın 22. kromozomunun uzun kolu üzerinde bulunmaktadır. CHEK2 geninin ürünü bir serin/treonin kinaz olup DNA-hasarı kontrol noktası yolağında bulunan merkezi bir öneme sahip iletim (transdüser) proteinidir. DNA hasarının meydana gelmesi DNA hasarına spesifik protein komplekslerinin oluşumunu başlatır. DNA çift iplik kırığının meydana gelmesi, çift iplik kırık hasarına spesifik protein kompleksi olan MRN [Mre11 ("meiotic recombination 11") - Rad50 - NBS1 ("Nijmegen Breakage Syndrome gene")] protein kompleksinin (algılayıcı proteinler) oluşumuna neden olur, bu kompleks de "Ataxia Telengiectasia Mutated" (ATM) genini aktive eder. Aktive olan ATM, CHEK2 proteinini fosforile eder. CHEK2 proteininin fosforlanması sonucunda hücrede birçok CHEK2 substratı, fosforilasyon ile aktive olur. CHEK2 substratlarının fonksiyonları sonucunda, DNA hasarı meydana gelen hücrenin yaşamının geleceği belirlenir (38,39). CHEK2, BRCA1 proteininin serin 988 (S988) aminoasitini fosforile ederek DNA tamirini başlatır. Buna ek olarak CHEK2 bir transkripsiyon faktörü olan "Forkhead box M1" (FOXM1)' i fosforile ederek bu transkripsiyon faktörünün stabilitesini artırır. FOXM1

transkripsiyon faktörü homolog rekombinasyon DNA tamir mekanizmasında görev alan BRCA2 ve baz eksizyon tamir mekanizmasında görev alan "X-ray repair cross complementing protein 1" (XRCC1) genlerinin ekspresyonlarını artırır (40). DNA'da meydana gelen hasarın tamir edilebilmesi için hücre DNA sentezini ve hücre döngüsünü durdurur. CHEK2 proteini, hücre döngüsünü düzenleyen anahtar moleküllerden biri olan "Cell division cycle 25 homolog C" (CDC25C)' nin inhibisyon aminoasiti olan serin 216 (S216)'yı fosforile ederek G2/M hücre döngüsü kontrol noktasının gecikmesine sebep olarak hücrenin mitoz bölünmeye girişine engel olur (41). Bununla birlikte CHEK2 proteini, diğer bir hücre döngüsü düzenleyici proteini olan "Cell division cycle 25 homolog A (CDC25A)' nın serin 123 (S123), serin 178 (S178) ve serin 292 (S292) aminoasitlerini fosforile ederek hücre döngüsünün G1 evresinin gecikmesine sebep olarak S evresine girişini engeller. Ayrıca CHEK2 proteini, DNA'da hasar meydana geldiğinde hücre döngüsünü G1/S ve G2/M hücre döngüsü kontrol noktalarında p53 tümör baskılayıcı proteini yolu ile durdurulmasında görev yapar. CHEK2 proteini p53 proteinini serin 20 (S20) aminoasitinden fosforile ederek p53'ün "Mousedouble minute 2 homolog" (MDM2) ile ilişkisini bozarak p53'ün stabilitesini artırır. DNA'da hasarlar meydana geldiğinde bir transkripsiyon faktörü olan "Apoptosis antagonizing transcription factor" (AATF), ATM ve CHEK2 tarafından fosforile edilerek aktive edilir. AATF, p53 ekspresyonunu artırır. Ayrıca DNA hasarı durumunda p53'ün serin 366 (S366) ve treonin 387 (T387) aminoasitleri CHEK2 proteini tarafından fosforlanarak p53 proteini aktive edilir (39).

Mutasyon CHEK21100(*)delC ve meme kanseri oluşumu arasındaki ilişki sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları belirlenmemiş ve ailesel meme kanseri hikayesi mevcut olan meme kanserli hastalar ile yapılan çalışma ile araştırılmıştır. Kontrol grubu ile meme kanserli grup karşılaştırıldığında CHEK21100(*)delC mutasyonunun meme kanseri oluşumunu 2 kat artırdığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu bildirilmiştir (42).

Mutasyon CHEK21100(*)delC frekansı mini baz sırası saptama yöntemi ile Finlandiya kökenli sağlıklı bireylerde, meme kanserli hastalarda ayrıca BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları saptanmayan ve ailesel meme kanseri öyküsü bulunan meme kanserli hastalarda araştırılmıştır. Bu araştırmada meme kanserli hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu, fakat ailesel meme kanserli hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve CHEK2 1100(*)delC mutasyonunun meme kanseri oluşumunu 4,2 kat artırdığı saptanmıştır ($p=0.0002$) (43).

PROSTATİK İNTRAEPİTELYAL NEOPLAZİ

Prostatik intraepitelyal neoplazi, yapısal olarak benign ancak, sitolojik olarak atipik hücrelerle döşeli büyük duktus ve asinuslardan oluşmaktadır (6). Hücresel kalabalıklaşma ve sıralanma artışı, nükleer büyüme, pleomorfizm ve nükleolus varlığı esas alınarak düşük dereceli ve yüksek dereceli prostatik intraepitelyal neoplazi olarak iki gruba ayrılmaktadır. Yüksek derecelide nükleol belirginliği esas alınmaktadır. HGPIN, prostat adenokarsinomlarının öncül lezyonu olarak kabul edilmekte ve çoğu prostat adenokarsinomuna eşlik etmektedir. HGPIN ve prostat kanserinde benzer genetik değişiklikler görülmektedir (6). Her ikisinde de diğer kanserlerdekine benzer şekilde, birçok somatik genomik değişiklik mevcuttur. Bazı somatik değişiklikler genetik olup, nokta mutasyonları, delesyonlar, amplifikasyonlar ve translokasyonlar şeklindedir. Diğer değişiklikler epigenetik olup, en önemlileri DNA metilasyonu ve histon modifikasyonundaki değişikliklerdir (24-26).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ait arşivdeki radikal ve açık prostatektomilerden 180 tanesi kullanıldı. 2007-2011 tarihleri arasındaki çeşitli yaşlardaki hastalardan alınmış tüm prostat biyopsileri incelenerek, normal prostat dokusu içeren 50 vaka ile birlikte, HGPIN tanılı 50 vaka ve adenokarsinom tanısı verilmiş 80 vakanın camları yedekleriyle birlikte ayrıldı. Adenokarsinom tanılı vakalar da kendi aralarında Gleason Skorlama Sistemi' ne göre üç gruba ayrıldı. Buna göre, Gleason skor 4' e kadar olanlar derece I, 5 ile 7 arası derece II, 8 ile 10 arası derece III olarak kabul edildi (6). Seçilen camlara ait bloklar, blok arşivinden elde edildi ve bloklardan polilizinli ve pozitif şarjlı lamlar üzerine alınan kesitlere immunohistokimyasal olarak BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 antikorları uygulandı.

Çalışmada BRCA1 için Biocare Medical, MS110 klon, IgG1 izotip kiti; BRCA2 için GenWay Biotech,Inc., poliklonal IgG; CHEK2 için Abcam Inc., poliklonal IgG kitleri kullanıldı. Her kit için katalogda belirtilen kontrol dokularını içerir biyopsi örnekleri ile kontrol boyaması yapıldı.

Boyanmada şu işlem sırası takip edildi:

1-4 mikron kalınlığında kesit alındı.

2-56ºC etüvde 1 gece bekletildi.

3-3 kez 10' ar dakika ksilende bekletildi.

4-3 kez 10' ar dakika %96' lık etil alkolde bekletildi.

5-Distile sudan geçirildi.

6-%3'lük H2O2' de 15 dakika bekletildi.

7-Distile suda 5 dakika bekletildi.

8-“EDTA buffer” %10’ luk solüsyonda maksimum devirde 20 dakika, 600 devirde 10 dakika muamele edildi.

9-Oda ısısında yarım saat bekletildi.

10-Distile sudan geçirildi.

11-Ultra V blok 10 dakika tutuldu.

12-Distile suda 3 dakika bekletildi.

13-PBS ile 5 dakika muamele edildi.

14-Primer antikor solüsyonu damlatıldı ve CHEK2 için 1 saat, BRCA1 ve BRCA2 için 48 saat +4ºC’ de buzdolabında bekletildi.

15-PBS ile 3 dakika muamele edildi.

16-Link sarı solüsyonda CHEK2 için 20 dakika, BRCA1 ve BRCA2 için 60 dakika bekletildi.

17- PBS ile 3 dakika muamele edildi.

18-Streptavidin solüsyonunda CHEK2 20 dakika, BRCA1 ve BRCA2 için 60 dakika bekletildi.

19- PBS ile 3 dakika muamele edildi.

20-Hematoksilen zıt boya 2 dakika süre ile uygulandı.

21-Çeşme suyunda 30 dakika bekletildi.

22-%1’ lik amonyakta 1 dakika bekletildi.

23-Çeşme suyundan geçirildi.

24-“Aquamount” ile kapatıldı.

DEĞERLENDİRME

Tüm kesitler önce tez araştırmacısı tarafından daha sonra tez yöneticisi ile birlikte değerlendirildi. Buna göre kontrol dokularındaki boyanma paterni ve katalogta belirtilen boyanma özelliklerine göre BRCA1 ve BRCA2 için sitoplazmik ve nükleer, CHEK2 için nükleer boyanma durumları değerlendirildi. Dokular BRCA1 ve BRCA2 antikorları için sitoplazmik boyanma şiddetine göre sınıflandırıldı. Buna göre; boyanma izlenmedi (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++), kuvvetli boyanma(+++) olarak kabul edildi. BRCA1, BRCA2 ve CHECK2 antikorları için ayrıca nükleer boyanma yaygınlığı tespit edildi ve olgular boyanma yaygınlığına göre % 50’ nin altında ve % 50-100 arası diye ikiye ayrıldı.

ANALİZ

Çalışmanın analizleri Biyoistatistik Anabilim Dalı' nda AXA507C775506FAN3 seri numaralı AXA 7,1 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Olguların yaşları tek yönlü ANOVA ile incelendi. Çalışmadaki antikorların boyanma oranları Ki-kare testi ile, bu antikorların boyanma oranlarının birbirleriyle ve olgu grupları ile olan ilişkileri Spearman korelasyon analizi ile gösterildi.

BULGULAR

Bu çalışmada normal prostat dokusu, HGPIN ve prostat adenokarsinomuna sahip dokularda DNA tamir mekanizmasında rol alan BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 genlerine ait mutasyonu gösteren immunohistokimyasal boyanma paternlerini değerlendirerek mevcut mutasyonun varlığını, çeşitli genlerdeki mutasyonların birbirleriyle ve prostat dokusunda artan malignite potansiyeli ile ilişkisini incelemeyi amaçlandı. Bu amaçla 2007-2011 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı'nda tanı almış olan, 50 normal prostat dokusu (%27,8), 50 HGPIN barındıran prostat dokusu (%27,8) ve 80 adenokarsinomlu prostat dokusu (%44,4) olan toplam 180 olguya ait doku incelendi.

İncelenen adenokarsinom tanısı almış olan olgular Gleason skorlarına göre derecelendirerek, 3 tanesi derece I (%3,75), 52 tanesi derece II (%65,0), 25 tanesi derece III (%31,25) olarak sınıflandı.

Tablo ve grafiklerde; nükleer boyanma yaygınlıkları %50' nin altı için 1, %50' nin üzeri için 2 olarak skorlandı. Sitoplazmik boyanmada ise boyanma izlenmedi: "0", zayıf boyanma (+): "1", orta şiddette boyanma (++): "2" ve kuvvetli boyanma (+++): "3" olarak skorlandı. Grupların isimlendirilmesinde benign olan normal prostat dokuları için "Grup B", HGPIN içeren prostat dokuları için "Grup H", malign yani adenokarsinomlu dokular için ise "Grup M" kullanıldı.

İstatistiksel çalışma sonucunda; normal prostat dokusuna sahip olgularda yaş ortalaması 69,96, HGPIN içeren olgularda yaş ortalaması 65,66, adenokarsinom tanılı olgularda ise yaş ortalaması 69 olarak tespit edildi.

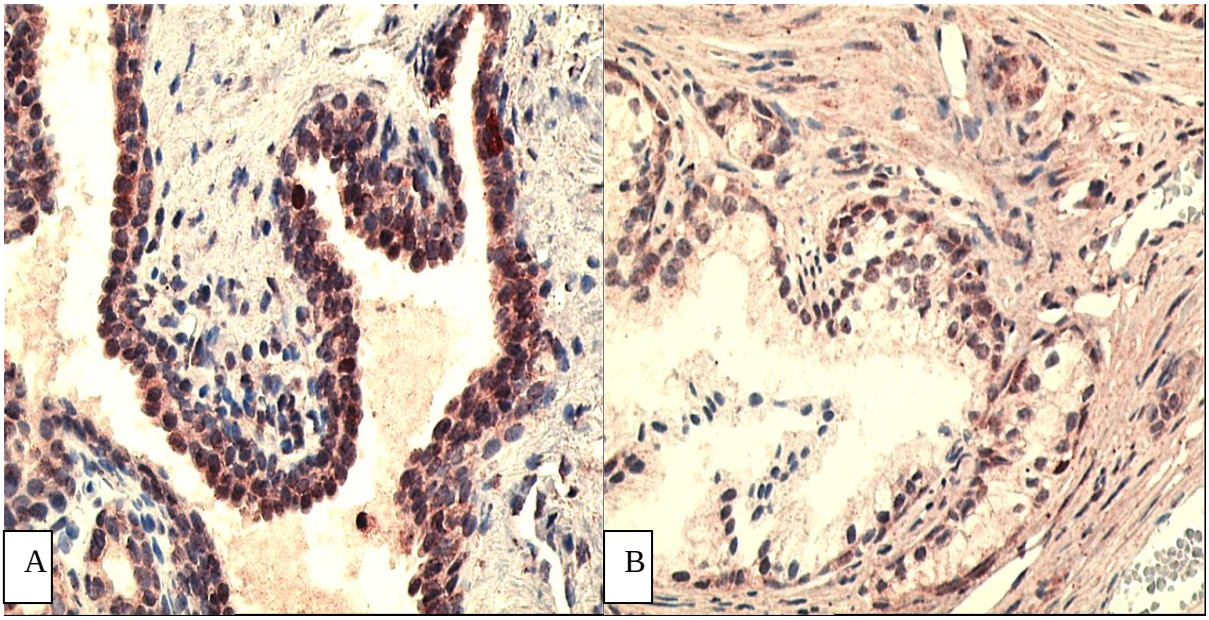
“BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY GENE 1” ANTİKORUNUN İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYANMA PATERNİNİN DEĞERLENDİRMESİ

“Breast cancer susceptibility gene 1” antikorunun (Biocare Medical, MS110 klon, IgG1 izotip) nükleer boyanma özelliklerine bakıldığında 42 (%84,0) normal prostat olgusunda %50’ nin altında, 8 (%16,0) olguda ise %50’ nin üzerinde pozitif reaksiyon izlendi (Şekil 1A). HGPIN grubunda 44 (%88,0) olguda %50’ nin altında, 6 (%12,0) olguda %50’ nin üzerinde pozitif reaksiyon izlendi (Şekil 1B). Adenokarsinom grubunda ise 49 (%61,3) olguda %50’ nin altında, 31 (%38,8) olguda ise %50’ nin üzerinde pozitif reaksiyon izlendi (Şekil 2A) (Tablo 1, Şekil 3).

Tablo 1. BRCA1’ in tanı gruplarına göre nükleer boyanma değerleri

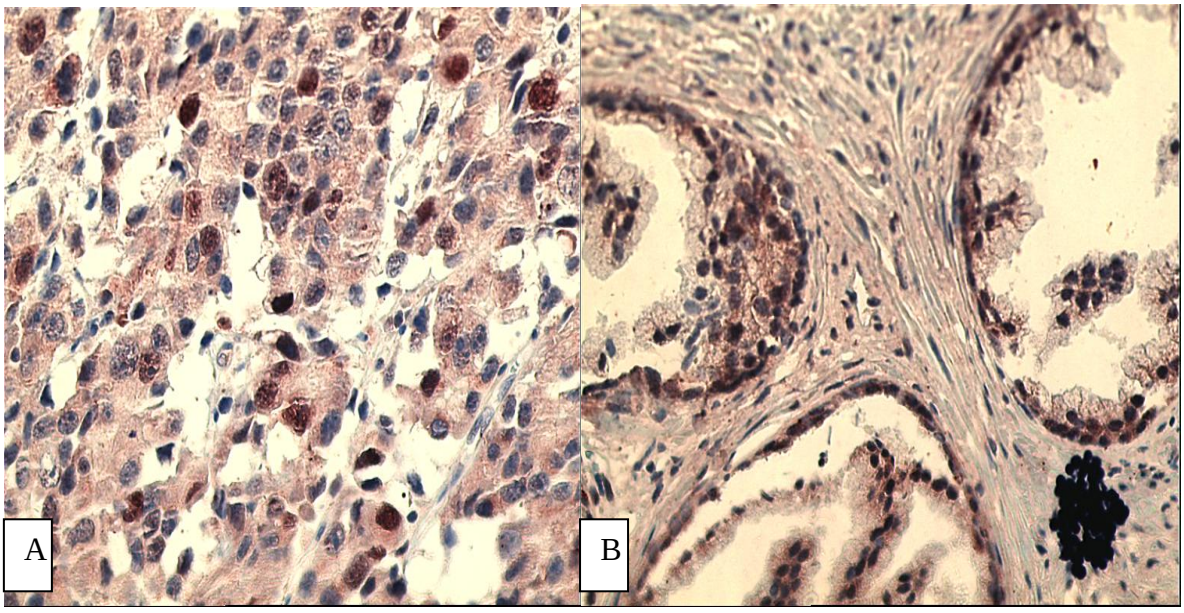
Boyanma yaygınlığı	*Grup B*	*Grup H*	*Grup M*
1	42 (%84,0)	44 (%88,0)	49 (%61,3)
2	8 (%16,0)	6 (%12,0)	31 (%38,8)

B: Benign, **H:** HGPIN, **M:** Malign, **1:** %50’ nin altında nükleer boyanma, **2:** %50’ nin üzerinde nükleer boyanma.

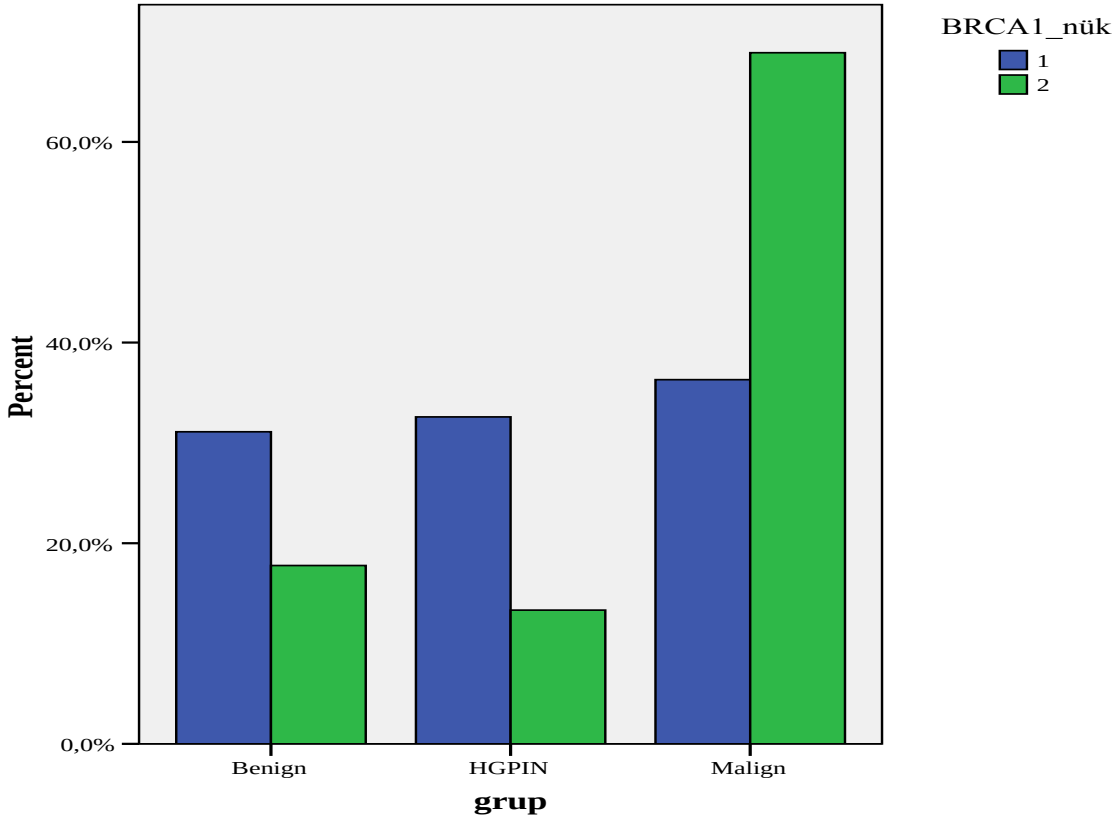


Şekil 1. A) Normal prostat bezinde BRCA1 ile nükleer boyanma (x200), B) HGPIN’ de BRCA1 ile nükleer boyanma (x200)

“Breast cancer susceptibility gene 1” sitoplazmik boyanma değerlendirmesinde, normal prostat dokularında 36 (%72,0) olguda boyanma izlenmedi. 11 (%22,0) olguda (+)(Şekil 2B), 3 (%6,0) olguda (++) sitoplazmik reaksiyon görülürken (+++) reaksiyon gösteren vaka olmadı (Şekil 4).



Şekil 2. A) Prostat adenokarsinomda BRCA1 ile nükleer boyanma (x400),B) Normal prostat bezinde BRCA1 ile +/+++ sitoplazmik boyanma (x200)



Şekil 3. BRCA1' in tanı gruplarına göre nükleer boyanma değerleri

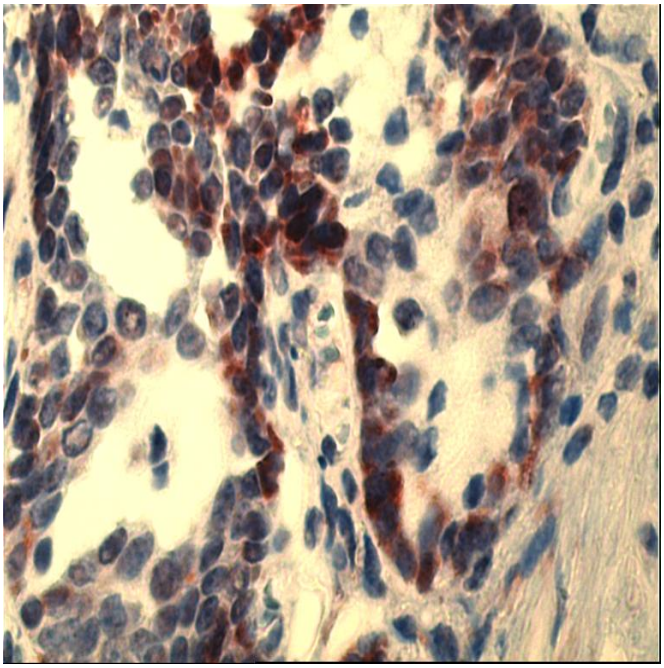
nük: Nükleer, **1:** %50' nin altında nükleer boyanma, **2:** %50' nin üzerinde nükleer boyanma.

Grup H'de 16 (%32,0) vakada boyanma izlenmedi. 16 (%32,0) vakada (+)(Şekil 5A), 11 (%22,0) vakada (++)(Şekil 5B), 7 (%14,0) vakada ise (+++) sitoplazmik reaksiyon tespit edildi (Şekil 6A).

Tablo 2. BRCA1' in tanı gruplarına göre sitoplazmik boyanma değerleri

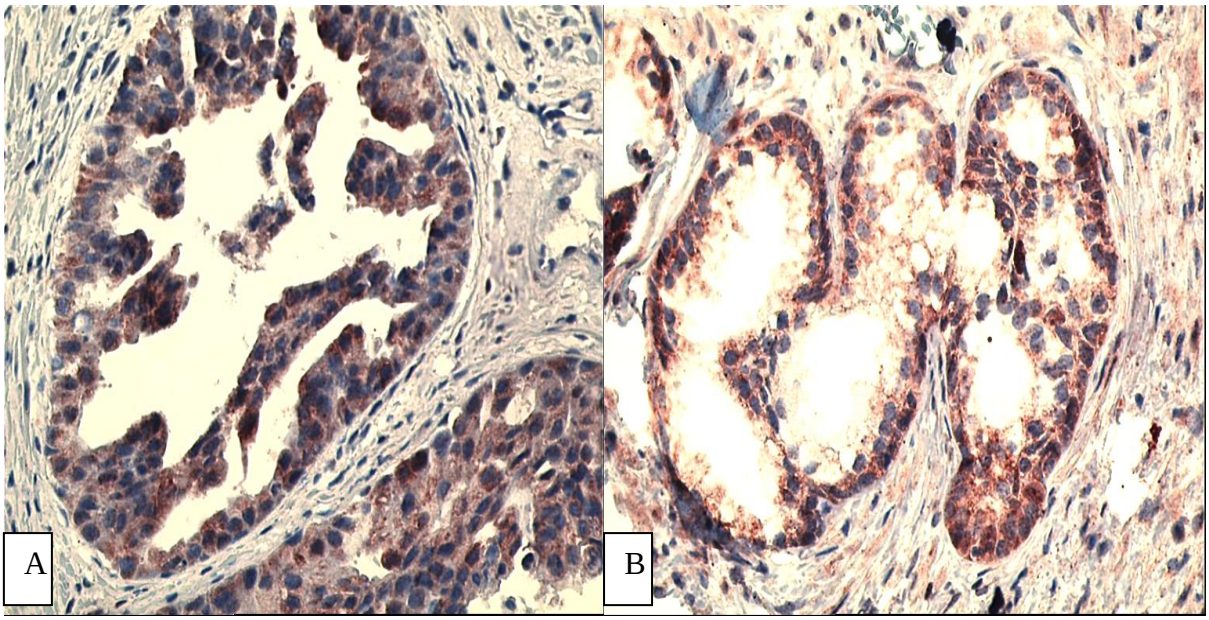
Boyanma yoğunluğu	*Grup B*	*Grup H*	*Grup M*
0	36 (%72,0)	16 (%32,0)	22 (%27,5)
1	11 (%22,0)	16 (%32,0)	26 (%32,5)
2	3 (%6,0)	11 (%22,0)	22 (%27,5)
3	0 (%0,0)	7 (%14,0)	10 (%12,5)

B: Benign, **H:** HGPIN, **M:** Malign, **0:** Boyanma izlenmedi, **1:** Zayıf boyanma (+), **2:** Orta şiddette boyanma (++), **3:** Kuvvetli boyanma (+++).

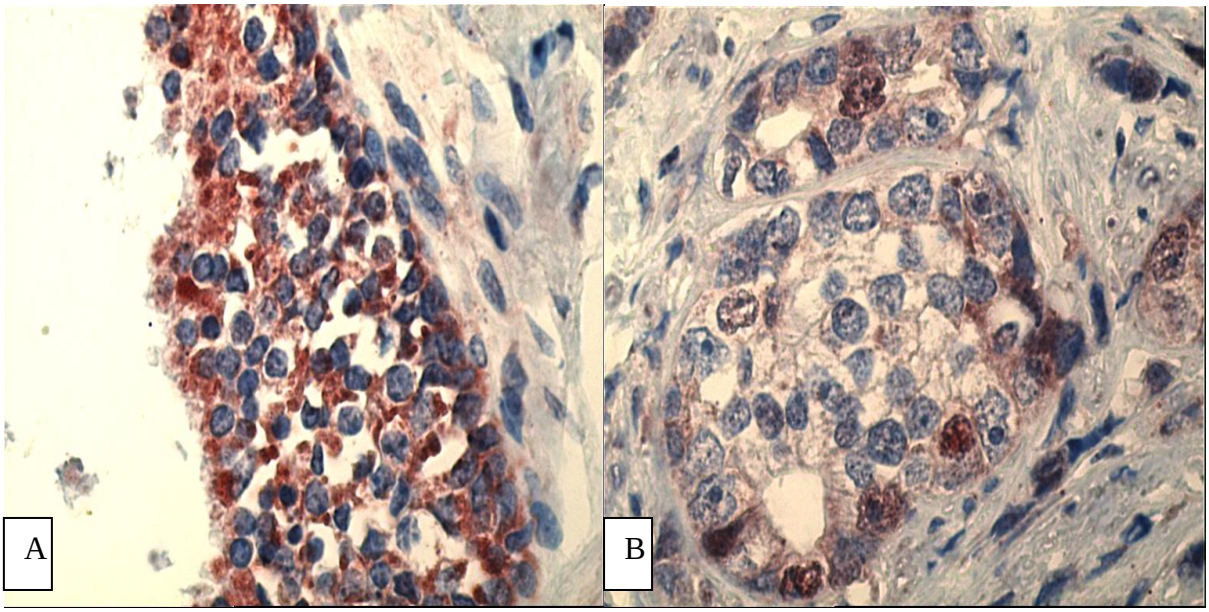


Şekil 4. Normal prostat bezinde BRCA1 ile ++/+++ sitoplazmik boyanma (x400)

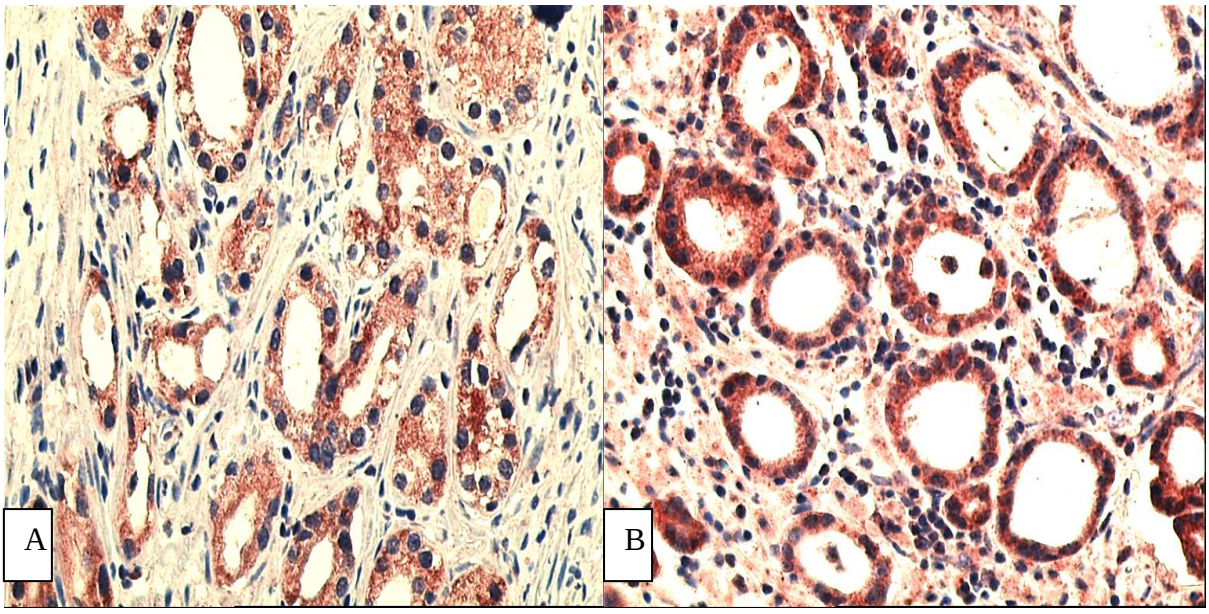
Adenokarsinomlu vakalarda 22 (%27,5) vakada boyanma izlenmezken 26 (%32,5) vakada (+)(Şekil 6B), 22 (%27,5) vakada (++)(Şekil 7A) ve 10 (%12,5) vakada (+++) reaksiyon görüldü (Şekil 7B)(Tablo 2, Şekil 8).



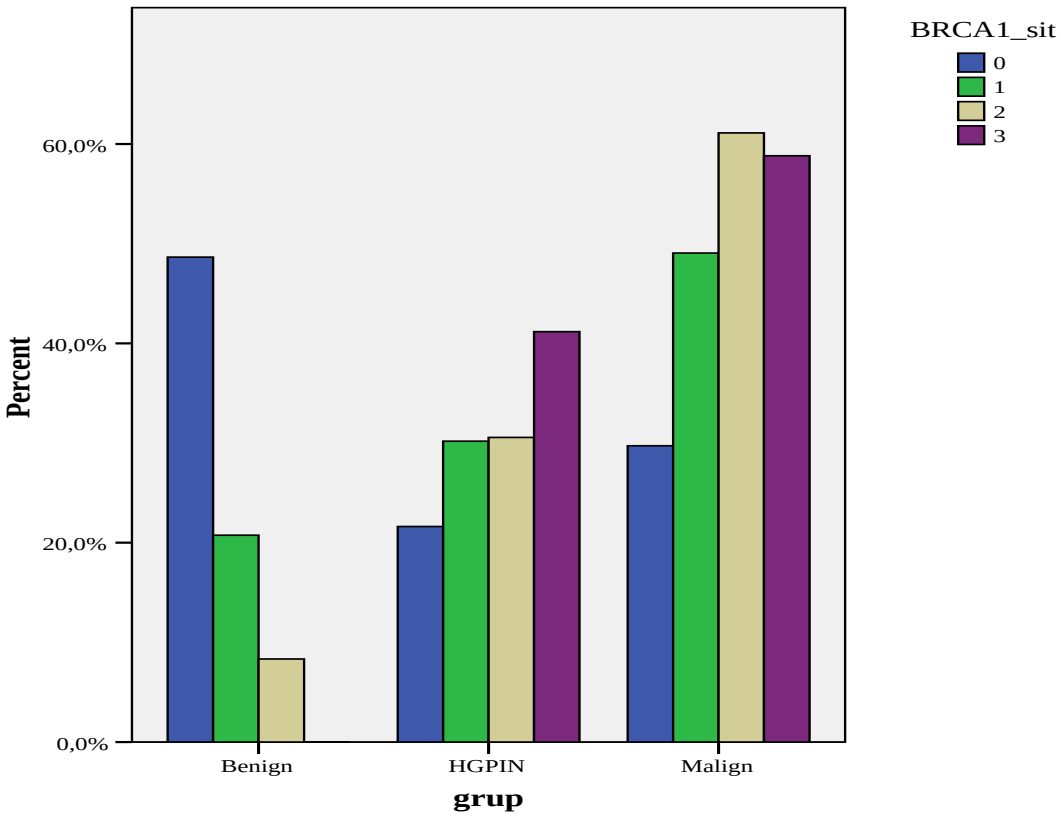
Şekil 5. A) HGPIN' de BRCA1 ile +/+++ sitoplazmik boyanma (x200), B) HGPIN' de BRCA1 ile ++/+++ sitoplazmik boyanma (x200)



Şekil 6. A) HGPIN' de BRCA1 ile +++/+++ sitoplazmik boyanma (x400),B) Prostat adenokarsinomda BRCA1 ile +/+++ sitoplazmik boyanma (x400)



Şekil 7. A) Prostat adenokarsinomda BRCA1 ile ++/+++ sitoplazmik boyanma (x200), B) Prostat adenokarsinomda BRCA1 ile +++/+++ sitoplazmik boyanma (x200)



Şekil 8. BRCA1' in tanı gruplarına göre sitoplazmik boyanma değerleri

sit: Sitoplazmik, **0:** Boyanma izlenmedi, **1:** Zayıf boyanma (+), **2:** Orta şiddette boyanma (++), **3:** Kuvvetli boyanma (+++).

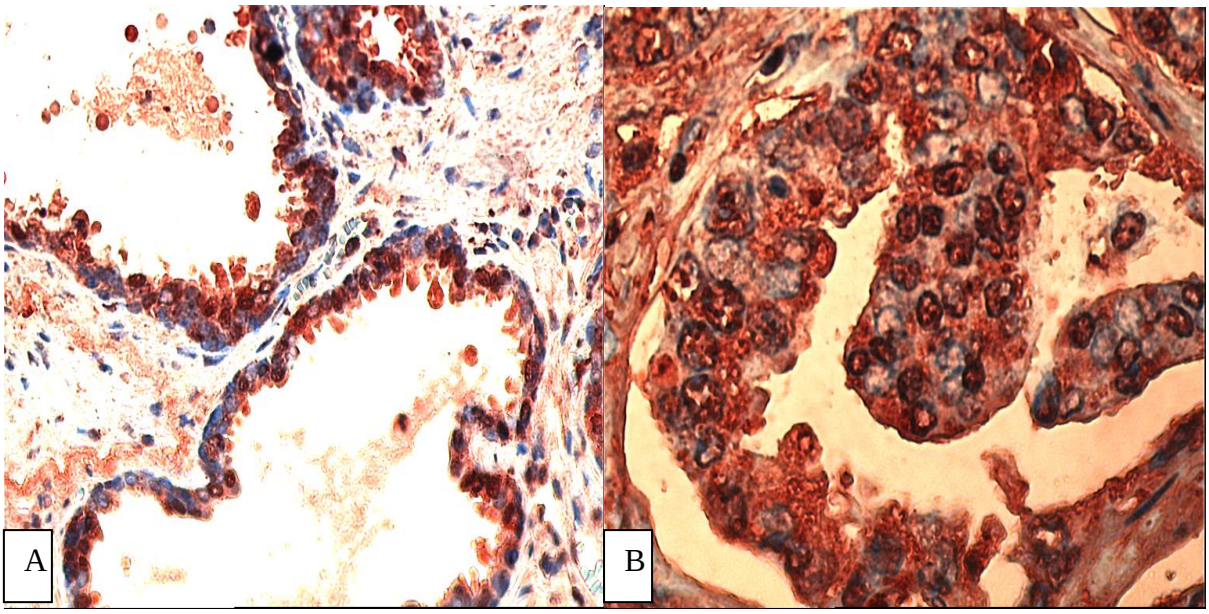
“BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY GENE 2” ANTİKORUNUN İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYANMA PATERNİNİN DEĞERLENDİRMESİ

“Breast cancer susceptibility gene 2” antikorunun (GenWay Biotech,Inc., poliklonal IgG) nükleer boyanma özelliklerine bakıldığında 36 (%72,0) normal prostat olgusunda %50’ nin altında, 14 (%28,0) olguda ise %50’ nin üzerinde pozitif reaksiyon izlendi (Şekil 9A). HGPIN grubunda 34 (%68,0) olguda %50’ nin altında, 16 (%32,0) olguda %50’ nin üzerinde pozitif reaksiyon izlendi (Şekil 9B). Adenokarsinom grubunda ise 47 (%58,8) olguda %50’ nin altında, 33 (%52,4) olguda ise %50’ nin üzerinde pozitif reaksiyon izlendi (Şekil 10A)(Tablo 3, Şekil 11).

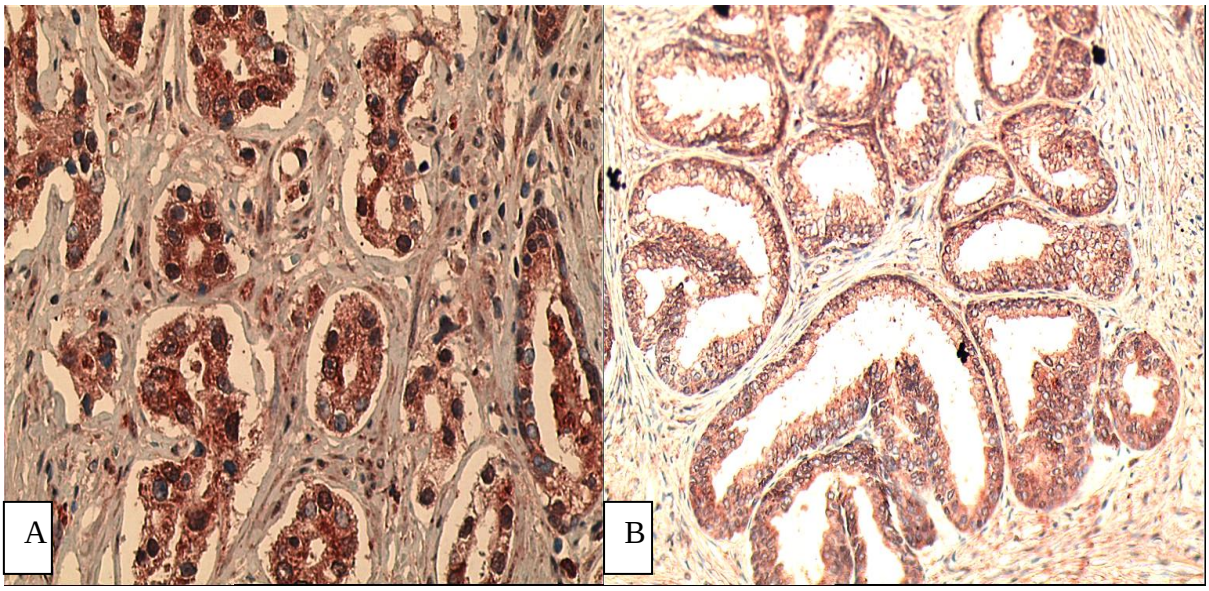
Tablo 3. BRCA2’ in tanı gruplarına göre nükleer boyanma değerleri

Boyanma yaygınlığı	*Grup B*	*Grup H*	*Grup M*
1	36 (%72,0)	34 (%68,0)	47 (%58,8)
2	14 (%28,0)	16 (%32,0)	33 (%41,3)

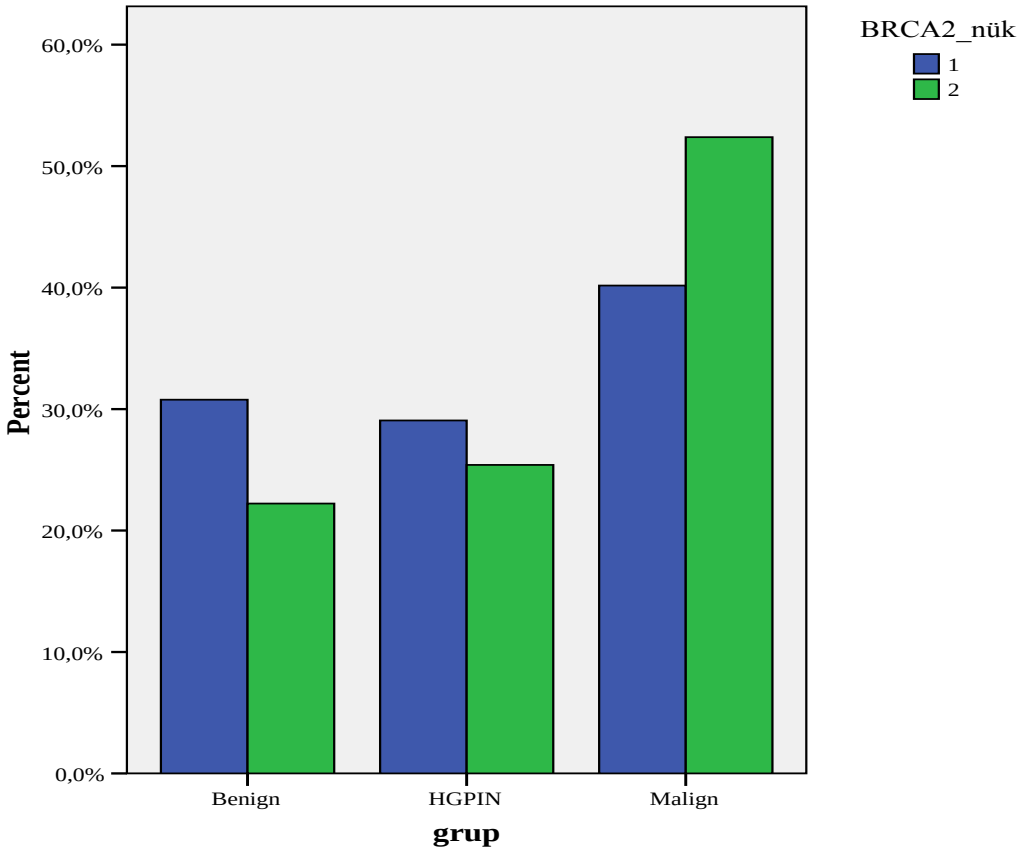
B: benign, **H:** HGPIN, **M:** Malign, **1:** %50’ nin altında nükleer boyanma, **2:** %50’ nin üzerinde nükleer boyanma



Şekil 9. A) Normal prostat bezinde BRCA2 ile nükleer boyanma (x200), B) HGPIN’ de BRCA2 ile nükleer boyanma (x400)



Şekil 10. A) Prostat adenokarsinomda BRCA2 ile nükleer boyanma (x200), B) Normal prostat bezinde BRCA2 ile +/+++ sitoplazmik boyanma (x200)



Şekil 11. BRCA2 'in tanı gruplarına göre nükleer boyanma değerleri

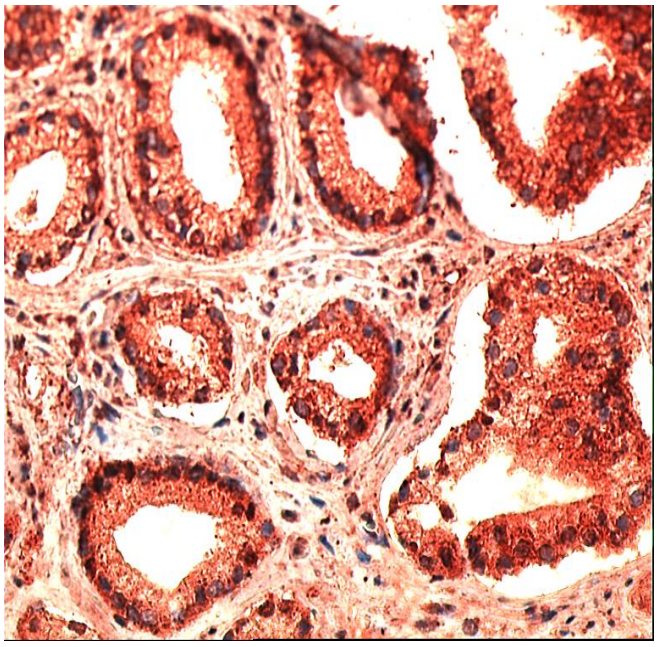
nük: Nükleer, **1:** %50' nin altında nükleer boyanma, **2:** %50' nin üzerinde nükleer boyanma.

BRCA2 sitoplazmik boyanma değerlendirmesinde, normal prostat dokularında 26 (%52,0) olguda boyanma izlenmedi. 14 (%28,0) olguda (+)(Şekil 10B), 10 (%20,0) olguda (++) sitoplazmik reaksiyon görülürken (+++) reaksiyon gösteren olgu olmadı (Şekil 12). HGPIN grubunda 3 (%6.0) olguda boyanma izlenmedi. 25 (%50,0) olguda (+)(Şekil 13A), 17 (%34,0) olguda (++)(Şekil 13B), 5 (%10,0) olguda ise (+++) sitoplazmik reaksiyon tespit edildi (Şekil 14A). Adenokarsinom grubunda 7 (%8,8) olguda boyanma izlenmezken 31 (%38,8) olguda (+)(Şekil 14B), 26 (%32,5) olguda (++)(Şekil 15BA ve 16 (%20,0) olguda (+++) reaksiyon görüldü (Şekil 15B)(Tablo 4, Şekil 16).

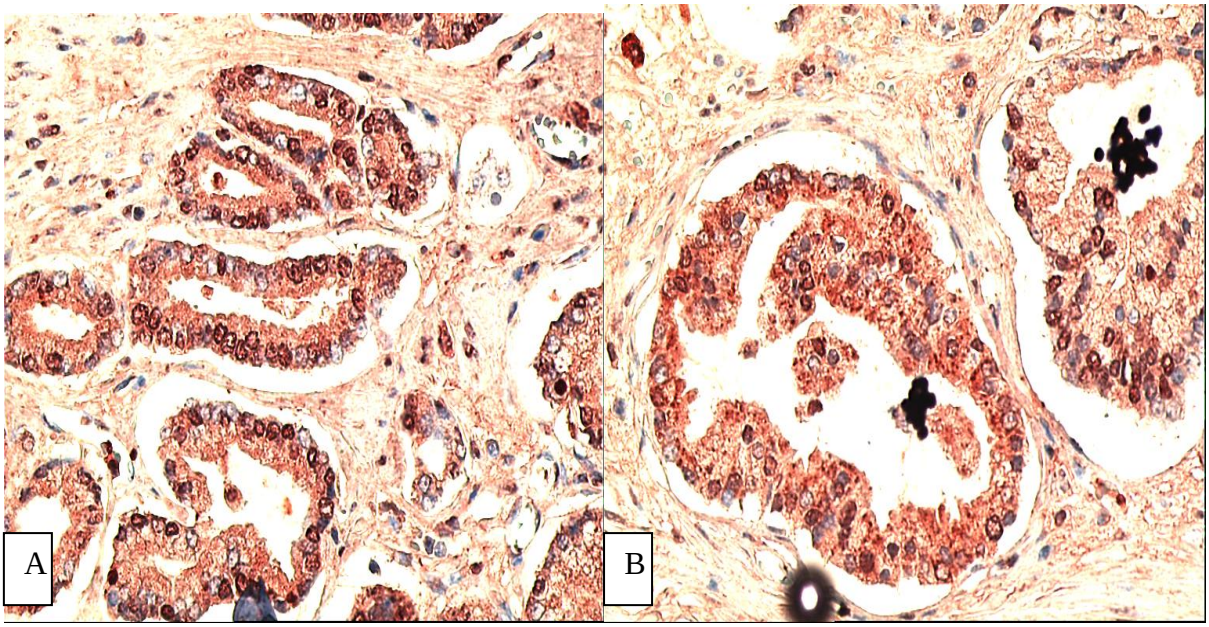
Tablo 4. BRCA2' in tanı gruplarına göre sitoplazmik boyanma değerleri

Boyanma yoğunluğu	*Grup B*	*Grup H*	*Grup M*
0	26 (%52,0)	3 (%6,0)	7 (%8,8)
1	14 (%28,0)	25 (%50,0)	31 (%38,8)
2	10 (%20,0)	17 (%34,0)	26 (%32,5)
3	0 (%0,0)	5 (%10,0)	16 (%20,0)

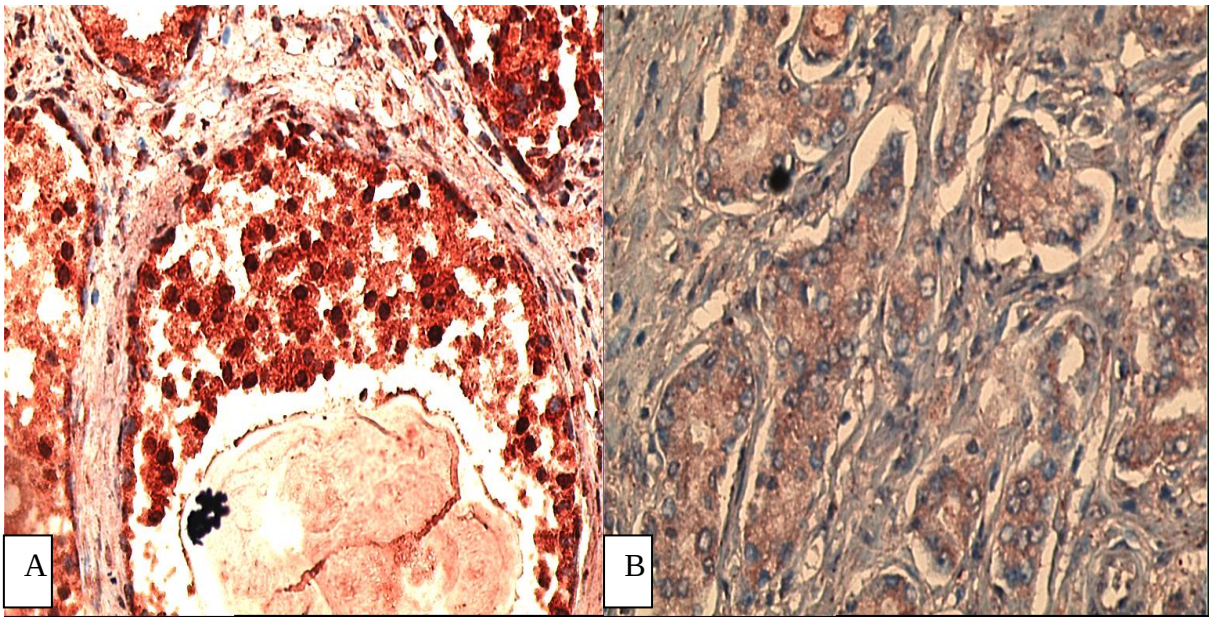
B: Benign, **H:** HGPIN, **M:** Malign, **0:** Boyanma izlenmedi, **1:** Zayıf boyanma (+), **2:** Orta şiddette boyanma (++), **3:** Kuvvetli boyanma (+++).



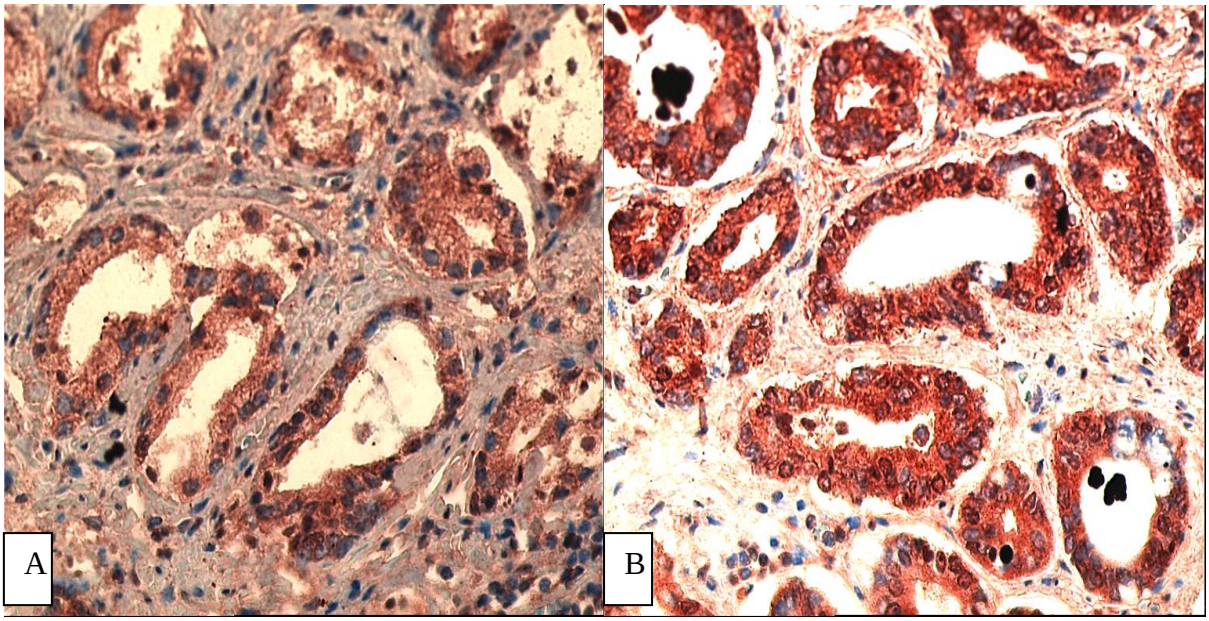
Şekil 12. Normal prostat bezinde BRCA2 ile ++/+++ sitoplazmik boyanma (x200)



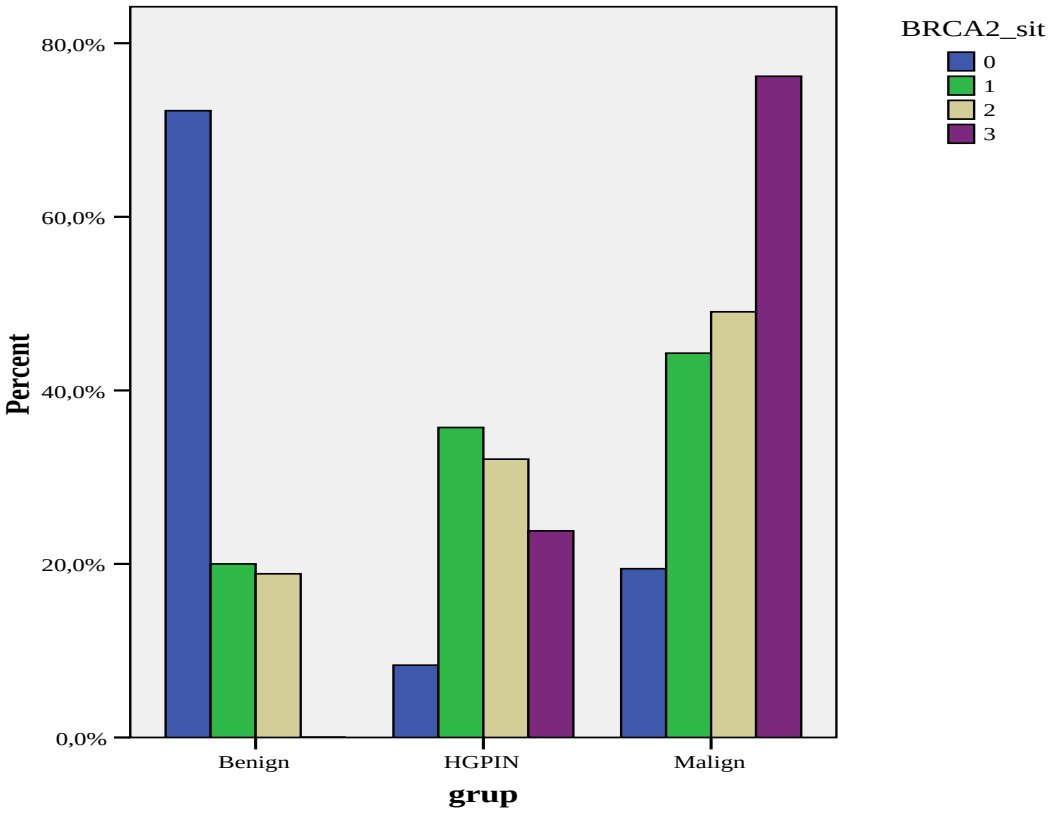
Şekil 13. A) HGPIN' de BRCA2 ile +/+++ sitoplazmik boyanma (x200),B) HGPIN' de BRCA2 ile ++/+++ sitoplazmik boyanma (x200)



Şekil 14. A) HGPIN' de BRCA2 ile +++/+++ sitoplazmik boyanma (x200), B) Prostat adenokarsinomda BRCA2 ile +/+++ sitoplazmik boyanma (x200)



Şekil 15. A) Prostat adenokarsinomda BRCA2 ile ++/+++ sitoplazmik boyanma (x200), B) Prostat adenokarsinomda BRCA2 ile +++/+++ sitoplazmik boyanma (x200)



Şekil 16. BRCA2 'in tanı gruplarına göre sitoplazmik boyanma değerleri

sit: Sitoplazmik, **0:** Boyanma izlenmedi, **1:** Zayıf boyanma (+), **2:** Orta şiddette boyanma (++), **3:** Kuvvetli boyanma (+++).

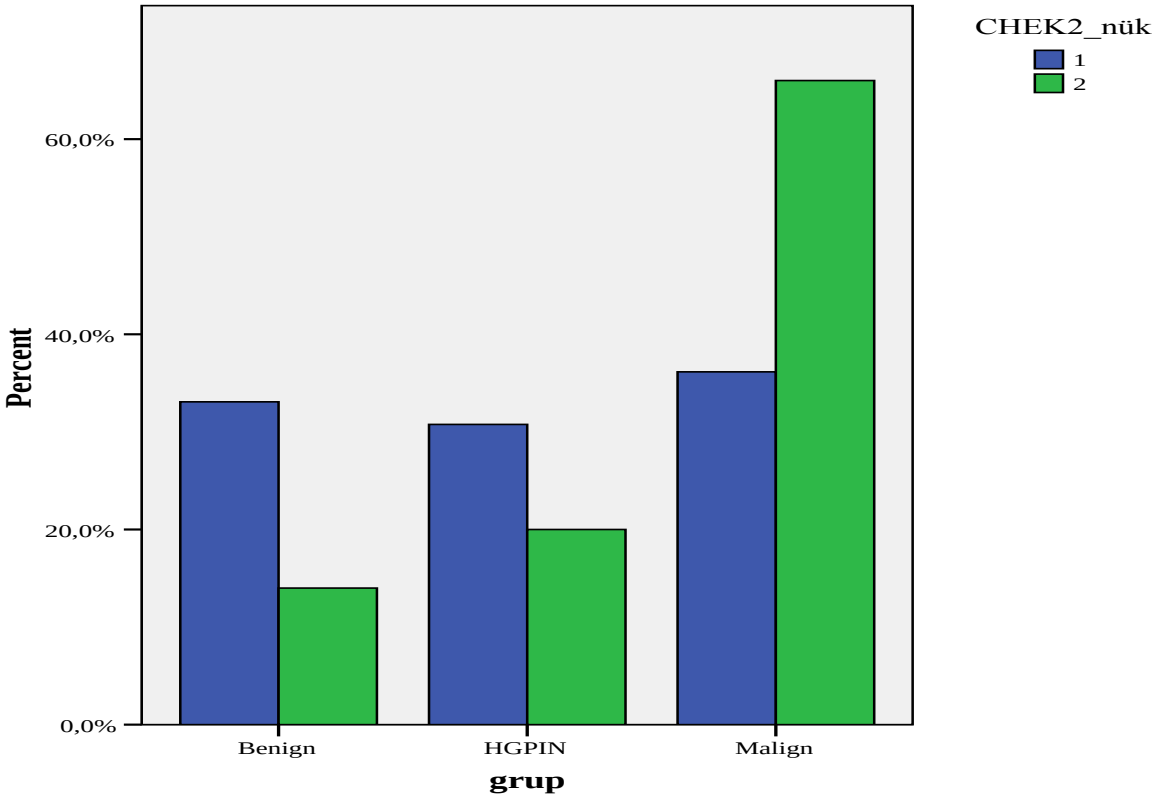
"CHECK POINT KINASE 2 GENE" ANTİKORUNUN İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYANMA PATERNİNİN DEĞERLENDİRMESİ

"Check point kinase 2 gene" antikorunun (Abcam Inc., poliklonal Ig) nükleer boyanma özelliklerine bakıldığında 43(%86,0) normal prostat olgusunda %50' nin altında, 7 (%14,0) olguda ise %50' nin üzerinde pozitif reaksiyon izlendi (Şekil 18A). HGPIN grubunda 40 (%80,0) olguda %50' nin altında, 10 (%20,0) olguda %50' nin üzerinde pozitif reaksiyon izlendi (Şekil 18B). Adenokarsinom grubunda ise 47 (%58,8) olguda %50' nin altında, 33 (%52,4) olguda ise %50' nin üzerinde pozitif reaksiyon izlendi (Şekil 18C-D)(Tablo 5, Şekil 17).

Tablo 5. CHEK2' nin tanı gruplarına göre nükleer boyanma değerleri

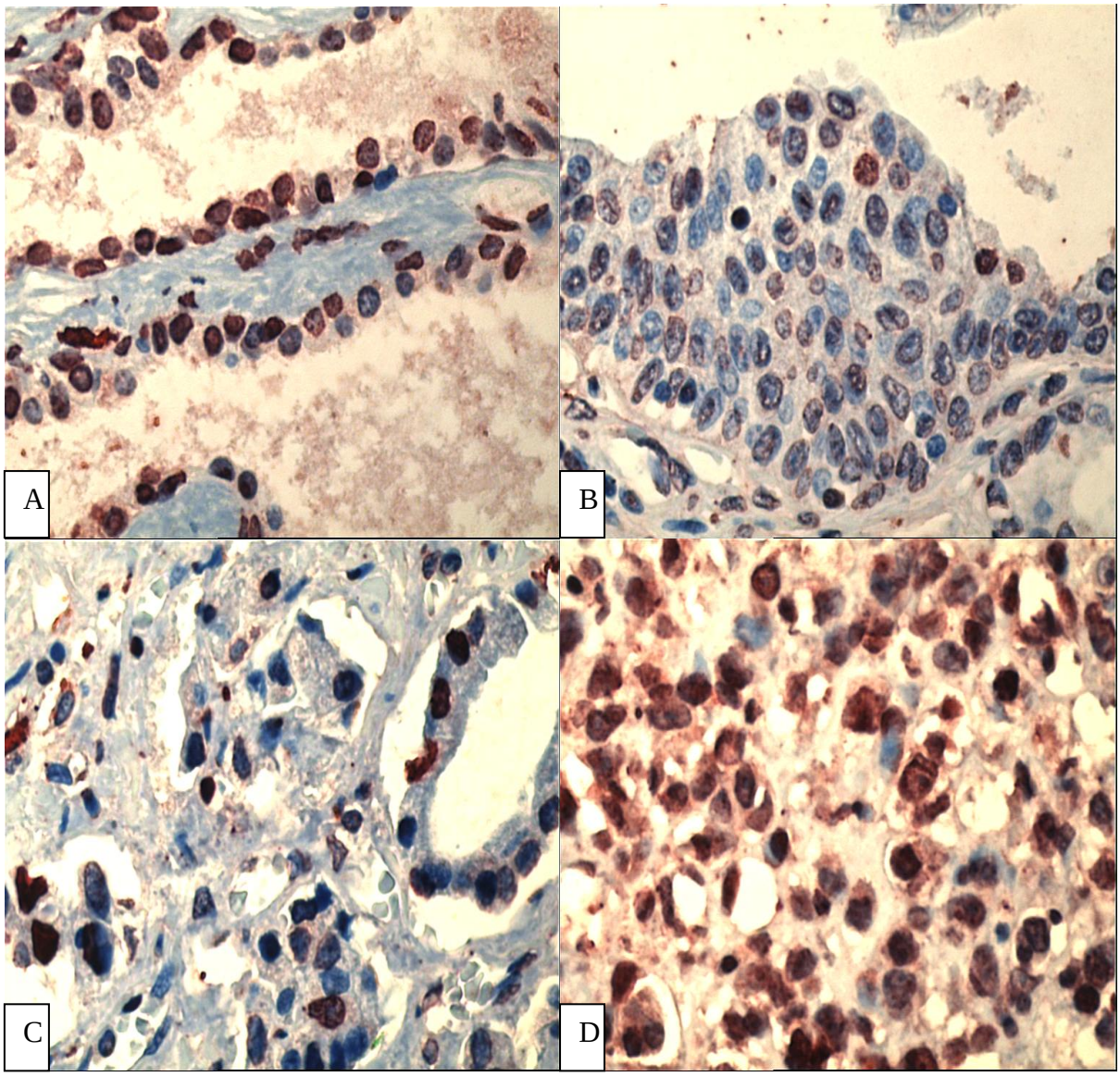
Boyanma yaygınlığı	*Grup B*	*Grup H*	*Grup M*
1	43 (%86,0)	40 (%80,0)	47 (%58,8)
2	7 (%14,0)	10 (%20,0)	33 (%41,3)

B: benign, **H:** HGPIN, M: malign, **1:** %50' nin altında nükleer boyanma, **2:** %50' nin üzerinde nükleer boyanma.



Şekil 17. CHEK2' nin tanı gruplarına göre nükleer boyanma değerleri

nük: Nükleer, **1:** %50' nin altında nükleer boyanma, **2:** %50' nin üzerinde nükleer boyanma.



Şekil 18. A) Normal prostate bezinde CHEK2 ile nükleer boyanma (x400), B) HGPIN' da CHEK2 ile nükleer boyanma (x400), C-D) Prostat adenokarsinomda CHEK2 ile nükleer boyanma (x400)

ANTİKORLARIN NÜKLEER ve SİTOPLAZMİK BOYANMA ÖZELLİKLERİNİN BİRBİRİYLE İLİŞKİSİ

Bu yönde yapılan çalışmalarda normal prostata ait dokularda antikorların boyanma özellikleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 6). Ancak HGPIN içeren prostat dokularında BRCA1' in nükleer boyanma yaygınlığı ile BRCA1' in sitoplazmik boyanma yoğunluğu arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ($p=0,012$). Benzer şekilde BRCA2' nin nükleer boyanma yaygınlığı ile BRCA2' nin sitoplazmik boyanma yoğunluğu

arasındaki ilişki de anlamlı bulunmuştur (p=0,012) (Tablo 7). Adenokarsinomlu dokularda sadece BRCA1 ile CHEK2' nin nükleer boyanma yaygınlıkları anlamlı bulunmuştur (p=0,015) (Tablo 8).

Tablo 6. Benign gruptaki antikorların boyanma özelliklerinin birbiriyle ilişkisi

	BRCA1 sit.	*BRCA1 nük.*	*BRCA2 sit.*	*BRCA2 nük.*	*CHEK2 nük.*
BRCA1 sit.	.	0,947	0.882	0,163	0,516
BRCA1 nük.	0,947	.	0,249	0,841	0,897
BRCA2 sit.	0,882	0,249	.	0,512	0,179
BRCA2 nük.	0,163	0,841	0,512	.	0,972
CHEK2 nük.	0,516	0,897	0,179	0,972	.

N: 50, p<0.05, **sit:** Sitoplazmik, **nük:** Nükleer.

Tablo 7. HGPIN grubundaki antikorların boyanma özelliklerinin birbiriyle ilişkisi

	BRCA1 sit.	*BRCA1 nük.*	*BRCA2 sit.*	*BRCA2 nük.*	*CHEK2 nük.*
BRCA1 sit.	**.**	**0,012**	0,585	0,278	0,493
BRCA1 nük.	**0,012**	**.**	0,103	0,324	0,832
BRCA2 sit.	0,585	0,103	**.**	**0,012**	0,089
BRCA2 nük.	0,278	0,324	**0,012**	**.**	0,179
CHEK2 nük.	0,493	0,832	0,089	0,179	.

N: 50, p<0.05, **sit:** Sitoplazmik, **nük:** Nükleer.

Tablo 8. Malign gruptaki antikorların boyanma özelliklerinin birbiriyle ilişkisi

	BRCA1 sit.	*BRCA1 nük.*	*BRCA2 sit.*	*BRCA2 nük.*	*CHEK2 nük.*
BRCA1 sit.	.	0,090	0,954	0,724	0,402
BRCA1 nük.	0,090	.	0,198	0,922	**0,015**
BRCA2 sit.	0,954	0,198	.	0,664	0,866
BRCA2 nük.	0,724	0,922	0,664	.	0,121
CHEK2 nük.	0,402	**0,015**	0,866	0,121	.

N: 50, p<0.05, **sit:** Sitoplazmik, **nük:** Nükleer.

ANTİKORLARIN NÜKLEER ve SİTOPLAZMİK BOYANMA DURUMLARININ ÇALIŞMA GRUPLARINDAKİ ARTAN MALİGNİTE POTANSİYELİYLE ve ADENOKARSİNOMLU GRUPTAKİ ÜÇ EVRE GRUBUYLA İLİŞKİSİ

Yapılan çalışmada BRCA1' in nükleer ve sitoplazmik boyanma yaygınlık ve yoğunluklarının çalışma gruplarındaki artan malignite durumu ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,001). BRCA2' nin sitoplazmik boyanma yoğunluğu da benzer şekilde anlamlı (p<0,001) iken BRCA2' nin nükleer boyanma yaygınlığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,180). CHEK2' nin boyanma yaygınlığı ise sözkonusu gruplardaki malign potansiyel ile istaistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,001) (Tablo 9).

Adenokarsinomlu gruptaki Gleason Skorlama Sistemi' ne göre üç evreye ayrılan olgularda, evrenin artışıyla çalışmadaki hiçbir antikorun boyanma durumu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.001) (Tablo 10).

Tablo 9. BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 antikorlarının boyanma yoğunluk ve yaygınlıklarının benign, HGPIN ve malign gruplardaki artan malignite potansiyeli ile ilişkisi

	Gruplar (B, H, M)
BRCA1 sit.	**0,000**
BRCA1 nük.	**0,001**
BRCA2 sit.	**0,000**
BRCA2 nük.	0,108
CHEK2 nük.	**0,000**

p<0.001, **sit:** Sitoplazmik, **nük:** Nükleer, **B:** Benign, **H:** HGPIN, **M:** Malign.

Tablo 10. BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 antikorlarının boyanma yoğunluk ve yaygınlıklarının malign gruba ait evrelerdeki artışla ilişkisi

	Evre (I, II, III)
BRCA1 sit.	0,295
BRCA1 nük.	0,332
BRCA2 sit.	0,827
BRCA2 nük.	0,949
CHEK2 nük.	0,848

p<0.001; **sit:** Sitoplazmik, **nük:** Nükleer, **I:** Gleason skor 2-4, **II:** Gleason skor 5-7, **III:** Gleason skor 8-10.

TARTIŞMA

Her iki cins gözönüne alındığında prostat kanseri dünyada altıncı en sık kanserdir ve erkeklerde en sık görülen kanserdir (2). Tespit edilen prostat kanseri vakalarının %75'i, 65 ve üzeri yaşlardadır (3,5). Çalışma grubumuzdaki adenokarsinomlu olguların yaş ortalaması 69 olup % 62,5' i 65 yaş ve üzerindedir.

Prostatik adenokarsinomu derecelendirmek hastaların tedavi ve takibi açısından çok önemlidir. Bu amaçla yapılan derecelendirme sistemleri içinde Gleason sistemi kabul görmüş ve 1996' da dünya çapında kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistem prognostik değeri olduğu ispatlanmış morfolojik bir parametredir. Bu zamana kadarki çalışmalar çoğu prostat karsinomunun Gleason skor 5 ve 7 arasında olduğunu, %10' dan daha az vakanın 2 ile 4, yaklaşık %20' sinin de 8 ile 10 arasında görüldüğünü göstermektedir (44,45). Bizim çalışmamızda Gleason skor 2 ile 4 arası olan vaka oranı % 3,75, Gleason skor 5 ile 7 arası olan vaka oranı %65 ve Gleason skor 8 ile 10 arası olan vaka oranı %31,25' tir.

Genomik instabilite birçok kanserde sıkça görülür (46,47). DNA hasar sinyal yolağı, DNA hasarına sebep olan olaylara karşı genomik stabiliteyi korumada kritik rol oynar (46,48). Bu yolağın bozulmasının kanser gelişimine sebep olduğu gösterilmiştir. Yine birçok çalışma DNA hasar sinyal yolağının prostat kanser gelişimindeki önemini ortaya çıkarmıştır (46,49). Bu yolak üzerinde çalışan meme kanseri predispozisyon genleri BRCA1 ve BRCA2' nin germline mutasyonları ailesel prostat kanserlerinde tespit edilmiştir (46,50). Hatta, bu ailelerdeki erkek bireylerde normal popülasyona göre 3,3 kat artmış prostat kanseri riski olduğu gösterilmiştir (46,51). CHEK2 de Rad53 ve ATM gibi bu yolağa katılan genler arasındadır (46,52-54).

"Breast cancer susceptibility" genlerinin yapıları birbirinden farklı olmasına rağmen fonksiyonları benzerdir. Bu iki genden kodlanan proteinler hasarlanmış DNA'nın tamirinde önemli rol oynarlar. BRCA2 proteini, DNA kırıklarını tamir etmek için Rad51 adı verilen genin ürünü olan rekombinaz proteini ile bağlanır ve bu iki gen birlikte iş görürler (28,37). Aynı şekilde BRCA1 proteini de Rad51 proteiniyle bağlanır ve bu üç gen genomik stabilitenin devam ettirilmesinde kritik bir görevi yerine getirirler.

Ökaryotlarda, hücre döngüsü siklin bağımlı kinazlarla (CDK) çalışır ve CDK inhibitörleri ile düzenlenir (55,56). CDK inhibitörlerinin ekspresyonundaki değişimler genel olarak malignite gelişiminde ve kısmen prostat karsinomunda etkili bulunmuştur (55,57-60). DNA hasar sinyal yolağında bulunan genlerden biri olan CHEK2, DNA hasarı ile aktive olur ve CDK2-cyclin E kompleksinin inhibisyonuna ve G1-S fazında hücre döngüsünün durmasına sebep olur. Ek olarak S fazında replikatif DNA sentezine de engel olarak DNA tamiri için zaman yaratır (55,61-64). CHEK2, BRCA1 proteininin serin 988 (S988) aminoasidini ve p53' ü fosforile ederek DNA tamirini başlatır(62,65-67) .

Buna ek olarak CHEK2 bir transkripsiyon faktörü olan FOXM1' i fosforile ederek bu transkripsiyon faktörünün stabilitesini artırır. FOXM1 transkripsiyon faktörü homolog rekombinasyon DNA tamir mekanizmasında görev alan BRCA2 ve baz eksizyon tamir mekanizmasında görev alan XRCC1 genlerinin ekspresyonlarını artırır (40).

Meme karsinomları üzerinde BRCA genlerinin etkinliği birçok çalışmayla kanıtlanmıştır. Bu genlerle prostat üzerinde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır ve bunların hemen hepsi moleküler yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda BRCA genlerinin prostat karsinomu gelişimindeki rolü ve özellikle DNA hasar sinyal yolağındaki işleyişi araştırılmıştır. İncelemelerin bir kısmı da özellikle herediter prostat karsinomu gelişim riskiyle ilgilidir (68).

Mao ve ark. yaptıkları bir çalışmada 71 klinik prostat kanseri ve 6 prostat kanseri hücre serisini incelemiş ve tümör baskılayıcı genlerin prostat kanseri gelişimindeki rolünü araştırmıştır (69). Bu çalışmada bazı tümör baskılayıcı genler olan p53, PTEN, BRCA1 ve BRCA2' nin prostat kanserindeki kromozom bozukluklarının sonucu tekrarlanarak kesintiye uğradıkları sonucuna varmışlardır.

Kirchhoff ve ark. yaptıkları bir çalışmada 251 prostat kanserli olguda BRCA gen mutasyonlarının durumunu incelemişlerdir (70). Kontrol guplarına göre BRCA1 ve BRCA2' de artmış bir delesyon mutasyonu saptanmış, yaş gruplarına göre bakıldığında ise prostat kanseri gelişimiyle BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları ilişkili bulunmuştur. Sonuçlar genlere

göre sıralandığında, BRCA2 mutasyonu taşıyıcılarının artmış prostat kanseri riski taşıdığını ancak BRCA1 mutasyonu taşıyıcılarında riskin anlamlı artış göstermediğini saptamışlardır.

Gallagher ve ark. yaptıkları çalışmada prostat kanseri riski ve histopatolojik derecelendirmesi ile BRCA mutasyonları arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir (71). Bu araştırmaya göre, literatürdeki dört çalışmayada BRCA ilişkili prostat kanserlerinde daha agresif bir fenotip tarif edilmiş ancak daha geniş bir çalışmada ise BRCA mutasyonu taşıyan ve taşımayan iki grup arasında histopatolojik olarak fark bulunmamış olduğu ifade edilmiştir (72-74). Buna ek olarak BRCA2 mutasyonu gösteren prostat tümörlerinde heterozigosite kaybı tarif edilmiş ve bu durum yüksek Gleason skoruna sahip olma durumu ile ilişkilendirilmiştir (71,75-77). Bu yönde, bu çalışmaya prostat kanserli 832 olgu dahil edilmiş, olgular yaş dışında Gleason skorlarına göre Gleason skor <7 ile ≥7 olarak ayrılmıştır. Sonuçta BRCA2 mutasyon taşıyıcılarının prostat kanseri ve yüksek histolojik derece açısından yüksek risk taşıdığına, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının ise agresif klinik gidişle bağlantılı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bağlamda, BRCA2' nin erken evre prostat kanserinde prostat spesifik antijen (PSA) ve klinik bulgularla birlikte bağımsız bir prognostik belirteç olabileceği öngörülmüştür. BRCA1 ise yüksek histolojik aktivite ile direkt ilişkili bulunmamıştır.

Bizim çalışmamızda da buradaki bazı çalışmalarla benzer olarak BRCA1 ve BRCA2' nin adenokarsinom içeren prostat dokularında normal dokulara göre artmış bir pozitiflik gösterdiği izlenmiştir. Prekanseröz bir lezyon olan HGPIN içeren dokularda ise adenokarsinom kadar olmasa da bariz bir boyanma farkı göze çarpmaktadır. Bu çalışmada BRCA antikorlarının boyanmasındaki artışın malignite potansiyeliyle doğru orantılı olduğu ortaya konabilmiş olsa da (Tablo 9) Gallagher ve ark.' nın BRCA2' nin prostat karsinomundaki yüksek histolojik aktiviteyle olan müspet yöndeki ilişkisini destekler bulgu elde edilememiştir (Tablo 10).

Literatürde prostat karsinomlarında CHEK2 geni ile yapılmış az sayıda çalışma mevcuttur ve bu çalışmaların tamamı moleküler yöntemlerle yapılmıştır.

Dong ve ark. prostat kanserli 578 olgu üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda CHEK2 mutasyonunun prostat kanseri riskini artırabileceğini ortaya koymuştur (46). Çalışmadaki diğer bir çıkarım ise prostat kanserinde CHEK2 mutasyonu varlığının kanser gelişiminde DNA hasar sinyal yolağının önemini ortaya çıkarmış olması ve bu yolak üzerinde çalışan BRCA1 ve BRCA2 proteininin prostat kanseri riskini artırdığı gerçeğini desteklediğidir.

Cybulski ve ark.' nın Polonyalı nüfus üzerinde yaptığı çalışmada prostat kanseri gelişiminde CHEK2' nin rolünü ortaya koymaya çalışmıştır (78). Bu amaçla çalışmaya dahil edilen 1921 kontrol olgusundan 9' unda, 690 prostat kanserli olgudan 11' inde CHEK2

mutasyonuna rastlanmıştır. Sonuçta CHEK2 kırpılma mutasyonlarının prostat kanserinde orta derecede, yanlış anlam mutasyonlarının ise daha az oranda riski artırdığına karar verilmiştir.

Cybulski ve ark. başka bir çalışmada da p27 ve CHEK2' nin kolon ve prostat karsinomu gelişimi riskine olan etkilerini vaka-kontrol yöntemiyle araştırmıştır (55). Bu amaçla yaş ortalaması 67,4 olan 1519 prostat kanserli, yaş ortalaması 63,3 olan 872 kolon kanserli, yaş ortalaması 55,2 olan 1956 meme kanserli olgu incelemeye alınmış; kontrol grubu olarak da 2183 yenidoğan, 1112 genç erişkin, 50 yaş üstü 517 erkek ve 984 kadın çalışmaya dahil edilmiştir. Buna göre p27' nin hücre döngüsü kontrolünde görev alan CDK inhibitörlerinden biri, CHEK2' nin de CDK2-cyclin E kompleksini inhibe eden bir protein olduğu, bu sayede iki genin de farklı yollardan hücre siklusunu G1-S fazında durdurarak birbiriyle olan ilişkilerinin açıklanabileceği belirtilmiştir (61). Bu bağlamda prostat ve kolon kanserli olgularda mutant CHEK2 ile artmış risk oranı doğrulanmış ancak aynı durum meme kanserli vakalar için sözkonusu olmamıştır. Çalışma sonucunda -birçok yazarın CHEK2'nin diğer bazı kansere duyarlılık yaratan genlerle olan ilişkili olabileceğinin belirtilmesinden destekle- CHEK2' nin p27' nin bazı allelleri ve genetik subtipleri ile ilişkisi olabileceği öne sürülmüştür (79-81).

Cybulski ve ark. Polonya'da yürüttükleri bir diğer çalışmada ise prostat kanserli hastaların %10' unda CHEK2 mutasyonu olduğunu, bu mutasyonun prostat kanseri riskini normal popülasyonda iki kat, ailesinde prostat kanseri olanlarda ise yaklaşık dört kat artırdığını ortaya koymuşlardır (82).

Seppälä ve ark. herediter prostat kanserine sahip 120 ve kontrol olarak kabul ettikleri 480 olguyla yürüttükleri çalışmada CHEK2 geninin prostat karsinogenezindeki rolünü araştırmak istemişlerdir (83). Çalışma sonucunda CHEK21100(*)delC mutasyonunun aile hikayesine sahip prostat kanserli olgularda görüldüğünü ortaya koymuşlardır.

Wu ve ark. 1997-1998 yılları arasında tanı almış 84 primer prostat kanserli cerrahi örnek üzerinde çalışmıştır (68). Sonuçta, prostat kanserinde etkisi ispatlanan germline ve somatik CHEK2 mtasyonlarının DNA' daki hasar ya da onkojenik strese cevap olan CHEK2 aktivasyonunu azaltarak kanser gelişimine sebep olduğu ortaya konmuştur.

Zheng ve ark. prostat kanseri gelişiminde etkisi gösterilmiş olan CHEK2 ve p53' ün prostat kanseri onkogenezinde biribiyle olan etkileşimini incelemek istemişlerdir (84). Sonuçta, iki genin çalışmaya dahil edilen prostat kanseri olgularının en az %25' inde biribirinin yerine iş görebileceği gösterilmiş ve bu bağlamda prostat kanseri gelişiminde DNA hasar sinyal yolağının önemi vurgulanmıştır.

Bizim çalışmamızda da benzer çalışmalarla uyumlu olarak prostat karsinomlu dokularda normal dokulara göre artmış CHEK2 ekpresyonu gösterilmiş ve CHEK2' deki bu artışın malignite potansiyeli ile doğru orantılı olduğu ortaya konmuştur (Tablo 9).

Hücreyi DNA hasarlarına karşı koruyan ve tümör baskılayıcı genler gibi iş gören birtakım genlerle ilgili özellikle birbirleri ile olan ilişkilerini ortaya çıkarmaya yönelik de çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan bazıları olan BRCA genleri ve CHEK2 geni, beraber çalışmakta ancak p27, ATM, Rad51 ve p53 gibi birtakım proteinlerle de ortaklaşa iş görerek DNA hasar sinyal yolağının doğru çalışmasını sağlamaktadır. Bu yönde yapılan çalışmalar onkogenezde birden fazla etkenin varolduğunu ortaya koymuştur ancak özellikle prostatta çoklu genetik ve immunohistokimyasal araştırmaların sayısı çok azdır (69,85).

Falchetti ve ark. İtalya'daki erkek meme kanserli olgularda BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 gen mutasyonlarının birlikteliği ve ilişkisi ile ilgili incelemelerde bulunmuşlardır (85). Bu yönde, 102 meme kanserli erkek hasta ve 263 kontrol grubu üyesi çalışmaya dahil edilmiştir. Buna göre ailesel meme kanseri yüksek olmayan insanlarda BRCA1 ve BRCA2 taranmasının avantaj sağlamayacağına ve CHEK2 mutasyonlarının da erkek meme kanserinde önemli bir rolü olmadığına karar verilmiştir.

Serrano-Fernández ve ark. meme kanserli kadın hastalardan oluşan iki vaka-kontrol serisinde BRCA2 ve CHEK2' nin etkilerini araştırmışlardır (86,87). Buna göre, BRCA2 kayıp mutasyonunun meme kanseri riskinde belirgin azalmayla ilişkili ve CHEK2 mutasyonlarının meme kanseri riskiyle hafif derecede ilişkili olduğu saptanmıştır. Şaşırtıcı olarak bu iki genin mutasyonlarının birlikteliği ise en yüksek risk oranına sahip olarak tespit edilmiştir.

Baynes ve ark.' nın yaptıkları çalışmada DNA hasar sinyal yolağında görevli olan ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 ve p53 genlerinin nadir mutasyonlarının meme kanserine olan duyarlılığı artırdığı gösterilmiş ancak polimorfik varyantlar için bu durumun geçerli olmadığı ispatlanmış ve bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu vurgulanmıştır (88).

Çalışmamızda BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 proteinlerinin ekpresyonlarını gösterir immunohistokimyasal tekniklerle yapılan incelemede üç proteinin ekpresyonunda da prostat adenokarsinomlu olgularda normal prostat ve HGPIN içeren olgulara göre belirgin artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Ayrıca bu proteinlerin immunohistokimyasal boyanma yaygınlık ve yoğunlukları, prostat adenokarsinomlu olgular içindeki Gleason skorlama sistemine göre ayrılan üç evre grubu ile ilişkisi açısından incelenmiş ancak anlamlı sonuca varılamamıştır($p>0.05$). Aynı yöntemle boyanma yoğunluklarının normal dokudan adenokarsinomlu dokulara doğru artan malignite potansiyeli ile olan ilişkisi incelenmiş BRCA2' nin nükleer boyanma paterni

haricinde tüm parametreler için anlamlı sonuç elde edilmiştir ($p<0.01$). Bu durum prostat karsinomlarında BRCA1, BRCA2 ve CHEK2' nin çeşitli mutasyonlarının varlığını ispatlayan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda normal prostat, HGPIN içeren ve prostat adenokarsinomlu olgulardan oluşan gruplardaki BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 antikorlarının boyanma yaygınlık ve yoğunluklarının, bu gruplar dahilinde birbirleriyle olan ilişkileri de incelenmiştir. Sonuçta normal prostat dokularında boyanma paternleri arasında bir ilişki gösterilememiştir ($p>0.05$). HGPIN içeren olgularda BRCA1 ve BRCA2' nin nükleer ve sitoplazmik boyanma yaygınlık ve yoğunlukları birbiriyle doğru orantılı saptanmıştır ($p<0.05$). Prostat adenokarsinomlu olgularda ise sadece BRCA1 ve CHEK2' nin nükleer boyanma yaygınlığı birbirleriyle ilişkili bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuçlar prostatik adenokarsinomlu grupta literatür ile farklılık göstermektedir. Bu protein ekpresyonlarının birbiriyle ilişkilerinde olan çelişkiler bahsi geçen genlerde delesyon ya da kırpılma gibi çeşitli şekillerde mutasyon izlenmesi ve DNA hasar sinyal yolağında bu genlerle birlikte başka genlerin de rol almasına bağlı olabilir.

Görünen odur ki, ayrı çalışmalarda prostat karsinomu gelişimindeki rolleri açıklanmış olan BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 genlerine ait protein ekpresyonları da benzer şekilde malignite potansiyeli ve karsinogenezis ile yakın ilişkilidir. Günümüzde ailesel meme kanseri hikayesi olan hastalarda BRCA genlerinin varlığı çeşitli yöntemlerle taranabilmektedir. Bizim çalışmamız ve buna benzer çalışmalar prostat kanseri hikayesi olan hastalarda da BRCA genlerinin ve CHEK2 geninin hem herediter tümör gelişim riski hem de mevcut hastalığın agresif seyrine ilişkin fikir verici olabilir. Bu açıdan ortaya konmuş olan veriler ailesinde prostat kanseri hikayesi olan ya da olmayan erkek bireylerde; BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 genlerinin taranmasının klinik seyir açısından faydalı olabileceğini öngörebilir. Ayrıca bu durum, BRCA mutasyonuna sahip meme karsinomlarında, son yıllarda kullanılmaya başlanan bazı tedavi yöntemlerinin aynı şekilde mutasyon gösteren prostat karsinomlarında da kullanılabilceğini düşündürmektedir.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı laboratuvarında 2007-2011 yılları arasında tanı almış 50 normal prostat dokusu içeren, 50 HGPIN içeren, 80 adenokarsinomlu vaka üzerinde; BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 antikorları ile yapılan, sözkonusu genlerin prostat karsinomu üzerindeki etkilerini araştırmak istediğimiz immunohistokimyasal çalışmada sonuçlar şunlardır:

1. BRCA1, BRCA2 ve CHEK2' nin sitoplazmik boyanma yoğunlukları ve nükleer boyanma yaygınlıkları değerlendirildiğinde; benign, HGPIN ve malign gruplar arasında önemli farklılıklar olduğu, özellikle malign grupta diğer iki gruba göre her üç antikorda da belirgin derecede artış olduğu tespit edilmiştir.

2. BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 antikorlarının boyanma durumları benign, HGPIN ve malign gruplarda birbirleriyle olan ilişkileri açısından değerlendirildiğinde; benign grupta antikorların boyanma durumları arasında belirgin ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$). HGPIN grubunda BRCA1 ve BRCA2' nin nükleer ve sitoplazmik boyanma yaygınlık ve yoğunlukları birbirleriyle anlamlı ilişki içindedir. Malign grupta ise sadece BRCA1 ve CHEK2' nin nükleer boyanma yaygınlılkları birbirleriyle anlamlı ilişki içinde tespit edilmiştir ($p<0.05$).

3. Benign, HGPIN ve malign gruplardaki malign potansiyel doğrultusunda BRCA2' nin nükleer boyanma durumu dışında tüm antikorların nükleer ve sitoplazmik boyanma yaygınlık ve yoğunlukları artış göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermiştir ($p<0.05$). Aynı yönde, malign grup içindeki Gleason skorlarına göre yapılan evre grupları ile hiçbir antikorda anlamlı artış ve ilişki gösterilememiştir ($p>0.05$).

Sonuç olarak, prostat dokularına göre prostat karsinomu ve öncül lezyonlarında BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 ekpresyonlarının değişen oranlarda artış gösterdiği ve bu genlerin tümör patogenezinde etkili olabileceği gösterilmiştir.

ÖZET

Prostat karsinomları erkeklerde en sık görülen kanserdir. Bunlar içinde de en sık asiner adenokarsinom görülür. BRCA genlerinin ailesel meme kanseri gelişimiyle yakından ilişkili olduğu birçok çalışmayla gösterilmiştir. CHEK2 ile bu genlerin birlikte araştırıldığı incelemeler de mevcuttur ancak prostat kanseri gelişiminde her üç proteinle de yapılan çalışma sayısı azdır.

Bu doğrultuda normal prostat dokusunda, HGPIN' de ve adenokarsinomda BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 proteinlerinin ekpresyonlarındaki değişimlerin incelenmesi amaçlandı. Bu dorultuda çalışmaya Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden 50 normal prostat dokusu, 50 HGPIN ve 80 prostat adenokarsinomu içeren toplam 180 olgu dahil edildi. Seksen asiner adenokarsinomlu olgu da kendi arasında Gleason skorlarına göre üç gruba ayrıldı. Olgulara yapılan yeni kesitlere immunohistokimyasal olarak BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 antikorları uygulanarak iki gözlemci tarafından ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

Elde edilen verilere göre BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 proteinlerinin ekpresyonları normal prostat dokularında ve HGPIN içeren dokularda benzer oranlardaydı ancak adenokarsinomlu dokularda bu iki gruba göre belirgin bir artış gözlendi. BRCA1, BRCA2 ve CHEK2 proteinlerinin ekpresyonları, BRCA2' nin nükleer boyanma oranı hariç, çalışmaya dahil edilen prostat dokularındaki malignite potansiyeli ile doğru orantılı olduğu saptandı ($p<0.01$). Ancak adenokarsinomlu dokulardaki Gleason skorlarına göre evrelenen olgularda görülmeyen bu eğilim agresif klinik gidişle ilişkilendirilemedi ($p>0.01$). Beraber iş gören bu üç proteinin ekpresyonlarının birbirleri ile ilişkileri de incelendiğinde ve normal prostat dokularında boyanma paternleri arasında bir bağlantı izlenmedi ($p>0.05$). HGPIN içeren

dokularda BRCA1 ve BRCA2' nin nükleer ve sitoplazmik boyanma oranları ile adenokarsinoma sahip dokularda BRCA1 ile CHEK2' nin nükleer boyanma oranlarının ilişkili olduğu saptandı ($p<0.05$).

Anahtar Kelimeler: CHEK2, BRCA1, BRCA2, prostat, adenokarsinom

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF BRCA1, BRCA2 AND CHEK2 EXPRESSIONS IN NORMAL PROSTATE, HIGH GRADE PROSTATIC INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA AND PROSTATIC ADENOCARCINOMA

SUMMARY

Prostatic carcinoma is the most frequent cancer in men and acinar adenocarcinoma is the most frequentof all. BRCA genes are closely related to hereditary breast cancer and this data is proved by a number of studies. Also there are some studies that investigate the relation of CHEK2 gene with these genes, but few studies are performed in prostate in that objective.

The aim of current study is to research alterations in expressions of BRCA1, BRCA2 and CHEK2 genes in normal prostate tissue, and prostate tissues with HGPIN and adenocarcinoma. Research is performed on a total number of 180 cases, between years 2007-2011, which consist of 50 normal prostate tissues, 50 prostate tissues with HGPIN and 80 with adenocarcinoma and which are selected from the archive of Trakya University Medical Faculty Pathology Department. In addition, cases of adenocarcinomas are graded and grouped with regard to Gleason scoring system. Immunohistochemical studies performed on the sections of cases and light microscopy was performed by two observers.

BRCA1, BRCA2 and CHEK2 expressions were almost similar in the cases of normal prostate and HGPIN, but there was significant increase in adenocarcinoma. BRCA1, BRCA2 and CHEK2 expressions were corelated with malignancy potency that cases included the study in all forms of staining pattern except for BRCA2's nuclear positivity rate ($p<0.01$). The

same trend was not observed in all three grade groups of adenocarcinoma and no relationship with agressive clinical course was proved statistically ($p>0.01$). We studied the corelation of three genes that work together and the results did not demonstrate any correlation with normal prostate tissues ($p>0.05$). Nuclear and cytoplasmic staining values of BRCA1/2 genes in cases of HGPIN and nuclear staining values of BRCA1 and CHEK2 genes in cases of adenocarcinoma were corelated with each other ($p<0.05$).

Key Words: CHEK2, BRCA1, BRCA2, prostate, adenocarcinoma

KAYNAKLAR

1. World Health Organisation (WHO). Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: The Institute;2004.

2. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. Lancet Oncol 2001;2:533-43.

3. Esen H. Prostat Adenokarsinomlarında PSA Değerlerinin Gleason Skor ve Klinik Evre ile İlişkisi (tez). Konya: Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi;2005.

4. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 1996;46(1):5 27.

5. Rosai J. Rosai and Ackerman's surgical pathology. Tenth ed. St. Louis: Elsevier Mosby, 2011:1295-7.

6. Bostwick DG, Cheng L. Urologic surgical pathology. Second ed. Edinburgh:Elsevier Mosby, 2008:469-70.

7. Lack EE, Kozakewich HPW. Embryology, developmental anatomy and selected aspects of non-neoplastic pathology. In: Lack EE (Ed.). Pathology of the adrenal glands. New York: Churchill Livingstone; 1990.p.317-22.

8. Lack EE. Pathology of adrenal gland and extra-adrenal paraganglia. In: Lack EE (Ed.). Major problems in pathology vol 29. Philadelphia: WB Saunders; 1994.p.186-219.

9. Zuckerkandl E. Ueber nebenorgane des sympathicus im retroperitonaealraum des menschen. Verh Dtsch Anat Ges 1901;15:95-107.

10. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Seventh ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005;1015-18.

11. Sizgen A. Prostat Adenokarsinomunda Ki-67 ve p53' ün İmmünhistokimyasal Ekpresyonlarının Tanı ve Derecelendirmede (Gradeleme) Önemi (tez). Şanlıurfa: Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi;2009.

12. Walsh P (Çeviri: A. Refik). Campbell Üroloji. Sekizinci baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2005:1237-96,3003-79.

13. Mc Neal JE. Histology for pathologists. Second ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997:997-1018.

14. Yıldırım HT. Prostata Ait Benign Glandüler Yapılar, Yüksek Dereceli Prostatik İntraepitelyal Neoplazi ve Adenokarsinomlarda IMP-3 Ekpresyonunun Belirlenmesi (tez). Denizli: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi;2011.

15. Çimen A. Anatomi. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1987:404-7.

16. Berber U. P53, E-cadherin ve PTEN İmmünreaktivitelerinin Prostat Asiner Adenokarsinoma Paternlerinde Karşılaştırılması (tez). İstanbul: TC. Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı;2006.

17. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2001:334-6.

18. Mc Neal JE. Normal histology of the prostate. Am J Surg Pathol 1988;12(8):619-33.

19. Mc Neal JE. Normal and pathologic anatomy of the prostate. Urology 1981;17(3):11-6.

20. Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 12th ed. Jackson: Elsevier Saunders, 2011:313-16.

21. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Seventh ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005;1024-58.

22. Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevead LL. Update on the Gleason Grading System for prostate cancer-results of an International Consensus Conference of urologic pathologists. Adv Anat Pathol 2006;13:57-9.

23. Ross RK, Pike MC, Coetzee GA, Reichardt YK, Yu MC, Feigelson H et al. Androgen metabolism and prostate cancer: Establishing a model of genetic susceptibility. Cancer Res 1998;58:4497-504.

24. De Marzo AM, DeWeese TL, Platz EA, Meeker AK, Nakayama M, Epstein JI et al. Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: Implication for diagnosis, detection, prevention and treatment. journal of cellular biochemistry. J Cell Biochem 2004;91(3):459-77.

25. Gurel B, Iwata T, Koh CM, Yegnasubramanian S, Nelson WG, De Marzo AM. Moleculer alterations in prostate cancer as diagnostic, prognostic and therapeutic targets. Adv Anat Pathol 2008;15:319-31.

26. Konishi N, Shimada K, Ishida E, Nakamura M. Molecular pathology of prostate cancer. Pathology International 2005;55:531-9.

27. Vukovic B, Park PC, Al-Maghrabi J, Beheshti B, Sweet J, Evans A, et al. Evidence of multifocality of telomere erosion in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HPIN) and concurrent carcinoma. Oncogene 2003;22:1978-87.

28. Tuncel T. Meme Kanserli Olgularda BRCA1 ve BRCA2 Genlerindeki Duplikasyon ve Delesyonların MLPA Tekniği İle İncelenmesi (tez). Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2010.

29. Puget N, Sinilkova O, Stoppa-Lyonnet, Audoynaud C, Pages S, Lynch H et al. An Alu-Mediated 6-kb Duplication in the BRCA1 Gene: A new founder mutation? Am J Hum Genet 1999;64:300-2.

30. Saeki H, Siaud N, Christ N, Wiegant WW, van Buul PPW, Han M et al. Supression of the DNA repair defects of BRCA2-deficient cells with heterologous protein fusions. PNAS 2006;103:8768-73.

31. Lixia M, Zhijian C, Chao S, Chaojiang G, Congyi Z. Alternative splicing of breast cancer associated gene BRCA1 from Breast Cancer Cell Line. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 2007;40(1):15-21.

32. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. Fourth Edition. New York: Garland Science, 2002:817-44.

33. Abaji C, Cousineau I, Belmaaza A. BRCA2 regulates homologous recombination in response to DNA damage: Implications for genome stability and carcinogenesis. Cancer Res 2005;65:4117-25.

34. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. Nat Genet 1996;14:185-7.

35. Smith D, Toft D. Steroid receptors and their associated proteins. Mol Endocrinol 1993;7:4-11.

36. Orelli B, Bishop D. BRCA2 and homologous recombination. Breast Cancer Res 2001;3:294-8.

37. Ayoub N, Rajendra E. The carboxyl terminus of BRCA2 links the disassembly of RAD51 complexes to mitotic entry. Current Biology 2009;19:1075-85.

38. Bayram S. CHEK2 Genindeki Mutasyonlar ile Hepatoselüler Kanser ve Kolorektal Kanser Arasındaki İlişkinin Araştırılması (tez). Adana: Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2010.

39. Antoni L, Sodha N, Collins I, Garrett MD. CHEK2 kinase: Cancer susceptibility and cancer therapy-two side of the same coin? Nat Rev Cancer 2007;7:925-36.

40. Lee JS, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. Nature 2000;404:201-4.

41. Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. Science 1998;282:1893-7.

42. Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, Weber M, Rahman N et al. Low penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. Nat Genet 2002;31(1):55-9.

43. Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, Syrjäkoski K, Ojala S, Kilpivaara O et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. Am J Hum Genet 2002;71(2):432-8.

44. Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevead LL, the ISUP Grading Committee. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. Am J Surg Pathol 2005; 29(9):1228-42.

45. Petersen RO, Sesterhenn IA, Davis CJ. Urologic pathology. 3rd ed. Washington: Lippincott Williams & Wilkins, 2009:489-90.

46. Dong X, Wang L, Taniguchi K. Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. Am J Hum Genet 2003;72:270-80.

47. Hoejimakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 2001;411:366-74.

48. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. Nat Genet 2001;27:247-54.

49. Fan Z, Chakravarty P, Alfieri A, Pandita TK, Vikram B, Guha C. Adenovirus-mediated antisense ATM gene transfer sensitizes prostate cancer to radiation. Cancer Gene Ther 2000;7:1307-14.

50. Gayther SA, de Foy K, Harrington P, Pharoah P, Dunsmuir WD, Edwards SM et al. The frequency of germ-line mutations in the breast cancer predisposition genes BRCA1 and BRCA2 in familial prostate cancer. The Cancer Research Campaign/British Prostate Group United Kingdom Familial Prostate Cancer Study Collaborators. Cancer Res 2000;60:4513-18.

51. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. Lancet 1994;343:692-5.

52. Paulovich AG, Hartwell LH. A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. Cell 1995;82:841-7.

53. Sanchez Y, Desany BA, Jones WJ, Liu Q, Wang B, Elledge SJ. Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. Science 1996;271:357-60.

54. Body MN, Furnari B, Mondesert O, Russell P. Replication checkpoint enforced by kinases Cds1 and Chk1. Science 1998;280:909-12.

55. Cybulski C, Gliniewicz B, Sikorski A, KĹ„adny J, Huzarski T, Gronwald J et al. Epistatic relationship between the cancer susceptibility genes CHEK2 and p27. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007;16(3):572-6.

56. Jacks T, Weinberg RA. The expanding role of cell cycle regulators. Science 1998;280:1035-6.

57. Cordon-Cardo C, Koff A, Drobnjak M, Capodieci P, Osman I, Millardet SS et al. Distinct altered patterns of p27KIP1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. J Natl Cancer Inst 1998;90:1284–91.

58. Cote RJ, Shi Y, Groshen S, Feng A, Cordon-Cardo C, Skinner D et al. Association of p27Kip1 levels with recurrence and survival in patients with stage C prostate carcinoma. J Natl Cancer Inst 1998;90:916–20.

59. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Ala-Opas M, Kosma VM. Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer. Prostate 1999;39:8–15.

60. Matsushima H, Sasaki T, Goto T. Immunohistochemical study of p21WAF1 and p53 proteins in prostatic cancer and their prognostic significance. Hum Pathol 1998;29:778–83.

61. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu Rev Biochem 2004;73:39-85.

62. Tischkowitz MD, Yilmaz A, Chen LQ, Karyadi DM, Novak D, Kirchhoff T et al. Identification and characterization of novel SNPs in CHEK2 in Ashkenazi Jewish men with prostate cancer. Cancer Letters 2008;270:173-80.

63. Chaturvedi P, Eng WK, Zhu Y. Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. Oncogene 1999;18:4047-54.

64. Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. Nature 2001;410:842-7.

65. Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. Genes Dev 2000;14:278-88.

66. Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1(Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. Genes Dev 2000;14:289-300.

67. Lee JS, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. Nature 2000; 404:201-4.

68. Wu X, Dong X, Liu W, Chen J. Characterization of CHEK2 mutations in prostate cancer. Human Mutation 2006;27(8):742-7.

69. Mao X, Boyd LK, Yáñez-Muñoz RJ. Chromosome rearrangement associated inactivation of tumour suppressor genes in prostate cancer. Am J Cancer Res 2011;1(5):604-17.

70. Kirchhoff T, Kauff ND, Mitra N, Nafa K, Huang H, Palmer C et al. BRCA mutations and risk of prostate cancer in Ashkenazi Jews. Clin Cancer Res 2004;10:2918-21.

71. Gallagher DJ, Gaudet MM, Pal P, Kirchhoff T, Balistreri L, Vora K et al. Germline BRCA mutations denote a clinicopathologic subset of prostate cancer. Clin Cancer Res 2010;16(7):2115-21.

72. Tryggvadóttir L, Vidarsdóttir L, Thorgeirsson T, Jonasson JG, Ólafsdóttir EJ, Ólafsdóttir GH et al. Prostate cancer progression and survival in BRCA2 mutation carriers. J Natl CancerInst 2007;99:929–35.

73. Mitra A, Bancroft EK, Barbachano Y. Prostate cancer in male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers has a more aggressive phenotype. Br J Cancer 2008;98:502–7.

74. Narod SA, Neuhausen S, Vichodez G, Armel S, Lynch HT, Ghadirian P et al. Rapid progression of prostate cancer in men with a BRCA2 mutation. Br J Cancer 2008;99:371–4.

75. Agalliu I, Gern R, Leanza S, Burk RD. Associations of high-grade prostate cancer with BRCA1 and BRCA2 founder mutations. Clin Cancer Res 2009;15:1112–20.

76. Giusti RM, Rutter JL, Duray JP, Freedman LS, Konichezky M, Fisher-Fischbein J et al. A twofold increase in BRCA mutation related prostate cancer among Ashkenazi Israelis is not associated with distinctive histopathology. J Med Genet 2003;40: 787–92.

77. Willems AJ, Dawson SJ, Samaratunga H, De Luca A, Antill YC, Hopper JL et al. Loss of heterozygosity at the BRCA2 locus detected by multiplex ligation-dependent probe amplification is common in prostate cancers from men with a germline BRCA2 mutation. Clin Cancer Res 2008;14:2953–61.

78. Cybulski C, Huzarski T, Gorski B. A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. Cancer Res 2004;64:2677-9.

79. CHEK2 Breast Cancer Consortium. Low-penetrance susceptibility to breastcancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. Nat Genet 2002;31:55–9.

80. Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. Am J Hum Genet 2002;71:432–8.

81. Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H, Wasielewski M, Wagner A, Hollestelle A et al. The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. Am J Hum Genet 2003;72:1308–14.

82. Cybulski C, Wokołorczyk D, Huzarski T. A large germline deletion in the CHEK2 kinase gene is associated with an increased risk of prostate cancer. J Med Genet 2006;43:863-6.

83. Seppälä EH, Ikonen T, Mononen N. CHEK2 variants associate with hereditary prostate cancer. British journal of Cancer 2003;89:1966-70.

84. Zheng L, Wang F, Qian C, Neumann RM, Cheville JC, Tindall DJ. Unique substitution of CHEK2 and TP53 mutations implicated in primary prostate tumours and cancer cell lines. Human Mutation 2006;27(10):1062-3.

85. Falchetti M, Lupi R, Rizzolo P. BRCA1/BRCA2 rearrangements and CHEK2 common mutations are infrequent in Italian male breast cancer cases. Breast Cancer Res Treat 2008;110:161-7.

86. Serrano-Fernández P, Debniak T, Górski B. Synergistic interaction of variants in CHEK2 and BRCA2 on breast cancer risk. Breast Cancer Res Treat 2009;117:161-5.

87. Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J. Molecular pathology of prostate cancer. J Clin Pathol 2005;58:673-84.

88. Baynes C, Healey CS, Pooley KA, Scollen S, Luben RN, Thompson DJ et al. Common variants in the ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 cancer susceptibility genes are unlikely to increase breast cancer. Breast Cancer Research 2007;9(27):1-14.

EKLER

Ek 1

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜBADK 2011/62	
	PROTOKOL ADI	Normal Prostat Dokusu, Premalign ve Malign Lezyonlarında BRCA-1, BRCA-2 ve CHEK2 Gen Mutasyonlarının İlişkisi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç. Dr. Ufuk USTA	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	☒ Tek Merkez ☐ Ulusal	☐ Çok Merkez ☐ Uluslararası

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 06/ 09**	**Tarih: 09.03.2011**
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında Görevli Doç. Dr. Ufuk USTA'nın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Araş. Gör. Dr. Tufan ÇİFTÇİ'nin tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, **araştırmaya ilişkin giderlerin T.Ü. Araştırma Projeleri (TÜBAP) tarafından karşılanması koşuluyla** gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına mevcudun oybirliği ile karar verilmiştir.	

DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜBADK Yönergesi

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Hakan KARADAĞ Başkan	Farmakoloji	T.Ü.T.F Farmakoloji A.D	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Doç. Dr. Hasan ÜMİT Başkan Yardımcısı	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Doç. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Üye	Çocuk Sağ. ve Hast.	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E☐ H☐	E☐ H☐	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E☐ H☒	E☒ H☐	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Biyoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Biyoloji A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E☐ H☐	E☐ H☐	
Doç. Dr. Tunç KUTOĞLU Üye	Anatomi	T.Ü.T.F. Anatomi A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Doç. Dr. Erhan TABAKOĞLU Üye	Göğüs Hastalıkları	T.Ü.T.F. Göğüs Hastalıkları A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Doç. Dr. Figen KULOĞLU Üye	Enfeksiyon Hastalıkları	T.Ü.T.F. Enfeksiyon Hastalıkları A.D.	K	E☐ H☐	E☐ H☐	
Doç. Dr. Ömer Nuri PAMUK Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Prof. Dr. Yener YÖRÜK Üye	Göğüs Cerrahisi	T.Ü.T.F. Göğüs Cerrahisi A.D.	E	E☐ H☐	E☐ H☐	
Doç. Dr. Recep YAĞIZ Üye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Doç. Dr. Ümit Nusret BAŞARAN Üye	Çocuk Cerrahisi	T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Yrd. Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Avukat Gülden ATİLLA ÖZTÜRK Üye		T.Ü. Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü	K	E☐ H☒	E☒ H☐	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Murat DİKMENGİL
Dekan