

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

MEME KANSERİ OLGULARINDA BRCA1 GENİ METİLASYON
PATERNİNİN MS-HRM YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YASEMİN CANNAZİK

DANIŞMAN

PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN

MART 2012

KABUL VE ONAY SAYFASI

Yasemin CANNAZİK' in Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı “Meme Kanseri Olgularında BRCA1 Geni Metilasyon Paterninin MS-HRM Yöntemi İle İncelenmesi ” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “KABUL” edilmiştir.

20.03.2012

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN (Danışman)

Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR

Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS

Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR

Üye: Yrd.Doç.Dr. Cengiz ÜSTÜNER

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23.03/2012.. tarih ve 98/424.1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr.Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Meme kanseri, meme hücrelerinin anormal çoğalma gösterdikleri genetik bir hastalıktır. Çevreyle, yaşam biçimiyle ve kalıtımla ilişkilidir. Ülkemizde kadınlarda görülen kanserlerin %24,1'ini meme kanserlerinin oluşturduğu belirtilmektedir. DNA metilasyonu, kanserlerin gelişiminde rol oynayan epigenetik mekanizmalardan biridir. Özellikle promotor bölgedeki CpG adacıklarının aşırı metilasyonunun farklı kanser tiplerinde tümör baskılayıcı genlerin susturulmasında ana mekanizmalardan biri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada BRCA1 geni mutasyonu olmayan 30 meme kanseri olgusunun tümör örnekleri ile periferik kan örneklerinde BRCA1 gen metilasyon değişimlerinin incelenmesi, meme kanserinde kullanılan tümörün derecesi, östrojen ve progesteron reseptörleri gibi bazı biyolojik belirteçler ile karşılaştırılarak aralarındaki ilişkilerin ortaya konması hedeflenmiştir. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda meme kanseri tanısı almış 30 hastanın hem periferik kan DNA'ları ve hem de meme kanserli tümör DNA örnekleri ile aile öykülerinde meme kanseri olmayan 30 kontrol bireyin kan örneklerinde BRCA1 geni metilasyon profilleri "Methylation Sensitive High Resolution Melting" (MS-HRM) yöntemi ile araştırılmıştır. İncelenen 30 kontrol bireyi örneklerinde aşırı BRCA1 metilasyonu gözlenmezken, 30 tümör örneğinde %60, periferik kan örneklerinde ise %16,7 oranlarında BRCA1 promotor aşırı metilasyonu saptanmıştır. Kan dokusunda metilasyon saptanan beş olgudan dördünün ileri evre meme kanseri olması dikkat çekiciydi. Araştırma grubunun periferik kan örneklerinde saptanan aşırı metilasyonun sirkülasyondaki serbest tümör hücrelerinden değil, somatik doku ile ilişkili olabileceği düşüncesindeyiz. Ayrıca olguların yaşları, östrojen ve progesteron reseptör durumları ve tümör dereceleri ile BRCA1 geni aşırı metilasyonu karşılaştırılmıştır. Kullandığımız MS-HRM tekniğinin metilasyon paternlerine ilişkin taramalarda yüksek doğruluk, zaman ve emek tasarrufu açısından uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, Metilasyon, BRCA1, MS-HRM

SUMMARY

Breast cancer is a type of cancer originating from abnormal proliferation of cells in breast tissue. It occurs because of an interaction between the environment, life style and defective genes. Worldwide, breast cancer comprises 10.4% of all cancers in women and the fifth most common cause of cancer-related death in women. In Turkey, breast cancer constitute of 24,1% of all cancers. DNA methylation is one of the epigenetic mechanisms that plays major role in cancer development and progression. The aberrant methylation of CpG islands of promoters of tumor suppressor genes has been shown to be involved in silencing of the genes in various cancer types.

This study was aimed to compare methylation patterns of BRCA1 gene in breast tumor tissues and peripheral blood samples of 30 breast cancer cases and to determine its correlation with clinico-pathological characteristics of the cases. Here, we used the methylation-sensitive high-resolution melting approach (MS-HRM) to examine the methylation status of the BRCA1, gene in tumor tissues and PBLs of the group of women diagnosed with breast cancer, and a control group with no signs of breast cancer. No aberrant methylation patterns was detected in control individuals whereas 60% and 16.7% of the tumor tissues and PBLs, respectively, had aberrant hypermethylation patterns in various levels. It was so interesting that four of five cases in whom hypermethylation was detected in their PBLs had advanced stage (GIII) tumors in their histopathological diagnosis.

Moreover, the BRCA1 aberrant methylation patterns of each case were compared with age, ER and PR status and tumor grades. This study was also confirmed that the Methylation-Sensitive High-Resolution Melting approach (MS-HRM) is an usable, time and labour saving technique for methylation screenings

Key Words: Breast cancer, Methylation, BRCA1, MS-HRM

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLOLAR DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. KANSER	3
2.1.1. Kanser Gelişimi	3
2.1.2. Kanser ve Genetik	4
2.1.2.1. Tümör Baskılayıcı Genler	4
2.1.2.2. DNA Tamir Genleri.....	5
2.1.2.3. Onkogenler	5
2.1.3. Kanser ve Epigenetik.....	5
2.1.3.1. Promotor Bölge Aşırı Metilasyonunun Kanser Oluşumundaki Rolü.....	6
2.1.3.2. Tümör Belirteci Olarak DNA Metilasyonu.....	8
2.2. MEME KANSERİ	8

2.2.1.Meme Kanseri Epidemiyolojisi	8
2.2.2. Meme Kanseri Etiyolojisi	9
2.2.2.1. Genetik Faktörler	10
2.2.2.1.1. Meme Kanserinde Etkili Olan Onkogenler	10
2.2.2.1.2. Meme Kanserinde Etkili Olan Tümör Baskılayıcı Genler	11
2.2.2.1.3. Meme Kanserinde Etkili Olan DNA Tamir Genleri.....	11
2.2.2.2. Epigenetik Faktörler	11
2.2.2.3. Endokrin faktörler.....	13
2.2.2.4. Çevresel Faktörler.....	14
2.2.3. Ailesel ve Sporadik Meme Kanseri	14
2.2.4. BRCA1 Geni.....	15
2.2.4.1.BRCA1 Proteini.....	16
2.2.4.1.1. RING Bölgesi	16
2.2.4.1.2. BRCT bölgesi	17
2.2.4.2. BRCA1 Promotoru	17
2.2.4.3.BRCA1 Fonksiyonu	18
2.2.4.4. BRCA1 ve Epigenetik	19
2.2.5. Meme Kanserinde Evreleme	20
2.2.5.1. Histolojik Tipleri	20
2.2.5.2. Histolojik Derece.....	22

2.3. Methylation Sensitive-High Resolution Melting (MS-HRM)	23
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
3.1.Hasta Grubu	24
3.2.Gereçler	24
3.2.1.Kullanılan Gereçler.....	25
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	25
3.2.3. BRCA1 Geni Metilasyon Analizinde Kullanılan Primerler	26
3.3. Yöntemler	27
3.3.1.Taze Doku ve Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi.....	27
3.3.2. Bisüfit Dönüşüm İşlemi.....	28
3.3.3. MS-HRM Cihazına Yükleme	30
3.3.4.Değerlendirme	32
4.BULGULAR.....	34
4.1. Araştırma Grubunun Prognostik Özellikleri.....	34
4.1.Tümör ve Kan Dokularında MS-HRM Bulguları.....	36
4.1.1. Yaş ile BRCA1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	41
4.1.4. ER ile BRCA1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi	44
4.1.5. PR ile BRCA1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi.....	44
5.TARTIŞMA.....	46
5.1. MS-HRM Yöntemi İle BRCA1 Promotor Metilasyonu İçin Elde Edilen Verilerin Literatür İle Karşılaştırması.....	47

5.1.2. Periferik Kan Metilasyon Durumlarının Literatür İle Karşılaştırılması	47
5.1.3 Tümör Metilasyon Durumlarının Literatür İle Karşılaştırılması	49
5.1.4. Metilasyon Durumları ve ER/PR Durumlarının Literatür İle Karşılaştırılması	52
5.1.5. Metilasyon Durumları ve Tümör Derecelerinin İlişkisinin Literatür İle Karşılaştırılması	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	60
ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Normal ve Kanserli Hücrede CpG Metilasyonunun Gen Ekspresyonuna Etkisi...	7
Şekil 2.2. 2008 Yılında Kadınlarda Kanser Nedenli Ölümlerin Miktar Grafiği.....	9
Şekil 2.3. Epigenetik ve Meme Kanseri Alanındaki Çalışmaların Artışı.....	12
Şekil 2.4. Meme Kanseri Gelişiminde Metilasyonun Rolü.....	13
Şekil 2.5. BRCA1 Proteini.....	16
Şekil 2.6. BRCA1 Geni Lokusu.....	17
Şekil 2.7. BRCA1 Promotor Bölgesi.....	18
Şekil 4.1. Metile ve Metile Olmayan Referans DNA'lerden Alınan Pikler.....	37
Şekil 4.2. Olgularımızın Tümör Dokularından Alınan Metile ve Metile Olmayan Pikler...	38
Şekil 4.3 Olgularımızın Kanlarından Alınan Metile ve Metile Olmayan Pikler.....	39
Şekil 4.4 %75 Metile Gözlenen Olgulardan Örnek.....	40
Şekil 4.5 Metile Olmayan Olgulardan Örnek.....	41

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Dünya Sağlık Örgütü Meme Kanseri Sınıflandırması.....	21
Tablo 2.2. Histolojik derecelemede kullanılan Bloom-Richardson sistemi.....	22
Tablo 4.1. Olguların Demografik Özellikleri ve Olguların Sayıları.....	35
Tablo 4.2. Olgularımızın Tümörlerinin BRCA1 Geni Promotor Metilasyonu Sayıları.....	39
Tablo4.3 Olgularımızın kanlarının BRCA1 Geni Promotor Metilasyonu Sayıları...	41
Tablo 4.4 Olguların Yaşları ve Metilasyon Durumları.....	42
Tablo 4.5. Metile ve Metile Olmayan Olguların Tümörlerin Derecesine Göre Dağılımı.....	43
Tablo 4.6 Metile ve Metile Olmayan Olguların ER Durumlarına Göre Dağılımı.....	44
Tablo 4.7. Metile ve Metile Olmayan Olguların PR Durumlarına Göre Dağılımı....	45
Tablo 5.1. Metilasyon Bulgularının Literatür İle Karşılaştırılması.....	57

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
DNA	:Deoksiribonükleik asit
DNMT	:DNA Metiltransferaz
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	:Etilen diamin tetraasetik asit
ER	:Östrojen Reseptör
HRM	:Yüksek çözünürlüklü erime eğrisi
kb	:Kilobaz
kDa	:Kilo Dalton
LOH	:Heterozigosite Kaybı (Loss Of Heterozygosity)
ml	:Mililitre
MS-HRM	:Metilasyona duyarlı yüksek çözünürlüklü erime eğrisi (Methylation Sensitive High Resolution Melting)
PBS	:Fosfat bazlı salin
PCR (PZR)	:Polimeraz zincir reaksiyonu
PR	:Progesteron Reseptör
RNA	:Riboz Nükleik Asit
TBE	:Tris borik asit EDTA
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü
°C	:Santigrat Derece
µl	:Mikro Litre

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, hücre büyümesi ve gelişmesine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı işlemler sonucu ortaya çıkmaktadır. Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir ve ülkemizde kadınlarda gözlenen tüm kanser olgularının %24,1'ini oluşturmaktadır. Lenf nodu metastazı, tümör çapı, histolojik derece ve histolojik tip en önemli prognostik faktörler olup, bunların yanı sıra steroid hormon reseptörleri ve moleküler belirteçlerin de prognoz üzerine etkisi bulunmaktadır (16, 47, 52).

Meme kanseri gelişimi, genetik ve epigenetik mekanizmaları içermektedir. DNA metilasyonu bugüne kadar en çok araştırılan epigenetik mekanizmalardan biri olup kanserin başlaması ve gelişmesinde önemli rol oynadığı pek çok araştırma ile ortaya konmuştur. Genlerin promotor bölgelerinde bulunan CpG adacıklarının aşırı metillenmesi sonucunda bu bölgelere transkripsiyon faktörlerinin bağlanması engellenmekte ve kromatin yapısında meydana gelen değişimler ile gen susturulmaktadır (28).

Son epidemiyolojik çalışmalar kanser ile anormal metilasyon nedeniyle gelişen bazı hastalıklarda metilasyon düzeyleri farklı dokularda ölçülmüş ve kan dokusu metilasyonu ile kolon, mesane, mide ve meme kanseri, şizofreni ve miyelodisplastik sendrom gibi hastalıkların metilasyon düzeyleri arasında bağlantı olduğu gözlenmiştir (65). Bu da kan dokusu DNA'sı metilasyonunun potansiyel bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceği fikrini doğurmuştur. Tümör dokusunun elde edildiği invaziv yöntemlere göre, kan dokusunun daha kolay elde edilebiliyor olması da periferik kan DNA'sı metilasyon seviyesinin ölçülmesini tercih sebebi yapabilir.

Meme kanserlerinin yaklaşık % 10 kadarında ailesel geçiş, yani genetik yatkınlıktan bahsedilir. Meme kanserine yatkınlıkta önemli genlerden biri kromozom 17

de lokalize bulunan 24 ekzonlu BRCA1 (“Breast Cancer 1” Meme Kanseri Geni) genidir. Bu gen bir tümör baskılayıcı gendir ve DNA tamirinde görev almaktadır. Kanseri gen gruplarından biri olan tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, bu genlerin fonksiyon kaybına neden olurlar. Baskılayıcı faktörlerin ortadan kalkması mutant hücrelerin proliferasyonuna yani tümörleşmeye neden olur. BRCA1 geninin DNA tamir özelliğini kaybetmesi hataların yavru hücrelere aktarılmasına yol açar ki meme kanseri yatkınlığında bu özellik öne çıkmaktadır. Bu nedenle meme kanseri tanısında BRCA1 geni önemli bir belirteçtir (40).

Farklı popülasyonlarda ailesel meme kanserlerinin yaklaşık %5-50’si BRCA1’in kalıtılan mutasyonları ile açıklanabilir. Ancak BRCA1’in somatik mutasyonları sporadik meme kanserlerinde nadir gözlenmektedir. Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kayıplarında DNA metilasyonu mekanizmasının önemli rolü olduğu gerçeğinden hareketle sporadik meme kanserlerinde BRCA1 fonksiyon kaybında aşırı DNA metilasyonu alternatif mekanizma olabilir.

Çalışmamızda meme kanseri tanısı almış, BRCA1 geninde MLPA yöntemi ile 35 bölgede mutasyon saptanmayan hastaların periferik kan ve tümör DNA’larında BRCA1 geni promotöründeki metilasyon durumlarının “**Methylation Sensitive-High Resolution Melting**” (MS-HRM) yöntemi ile incelenmesi hedeflenmiştir. Anormal metilasyon tiplerinin olgunun demografik özellikleri, hastalığın evresi ve prognozu arasında varsa ilişkisini ortaya koymak amaçlanmıştır. Bu araştırma meme kanseri için geliştirilecek tedavi yöntemlerine de ışık tutmak, hastalarımıza ait demografik ve prognostik bilgilerle bulduğumuz sonuçlar arasında ilişki saptayabilmek amacıyla yapılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser, hücrenin temel düzenleyici mekanizmalarındaki bozukluklardan kaynaklandığı için, özellikle moleküler ve hücresel düzeyde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır. Kanserin gelişmesine neden olan temel değişiklik kanser hücrelerinin sürekli, kontrolsüz çoğalmasdır. Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere doğru tepkiyi göstermek yerine kontrolsüz biçimde çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürerek, normal doku ve organlara da sızmakta (invazyon) ve sonunda tüm hücrelere yayılmaktadır (metastaz) (24).

Kanser patolojisindeki en önemli konu benign ve malign huylu tümörleri birbirinden ayırt etmektir. Benign tümörler çevredeki dokuya veya vücudun uzak bölgelerine yayılmayan ve etrafları bağ dokusu ile çevrelenmiş tümörlerdir. Buna karşılık malign tümörler hem kan ya da lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine, hem de çevredeki normal dokuya yayılarak metastaz yapabilme potansiyellerine sahiptirler (13).

2.1.1. Kanser Gelişimi

Kanser çok aşamalı bir süreçtir. Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi için çok sayıda genetik değişikliklerin ardı sıra gerçekleşmesi gerekmektedir. Bunlar arasında; nokta mutasyonları, translokasyonlar ve gen amplifikasyonları nedeniyle hücresel onkogen aktivasyonu ile tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sayılabilir (17).

Normal hücrelerde DNA'da meydana gelen hasarlar, DNA tamir enzimleriyle onarılmakta, onarılamadığı durumlarda tümör baskılayıcı genler ve apoptotik genlerin işbirliğiyle hücre apoptoza sürüklenir. Bu durumda mutant tümör potansiyeli olan hücrelerin yaşayabilme potansiyellerinin yetersiz olmasına bağlı olarak organizma kanser hücrelerinden temizlenir. Ancak organizmanın genetik yatkınlığının yanı sıra mutant hücrelerin yaşayabilme potansiyeli kazanmaları, hücre ileti sistemlerinin devamlı aktif kalması sonucu tümör hücreleri dokulara yayılmakta ve kanserleşmektedirler (13).

2.1.2. Kanser ve Genetik

Hücre bölünmesini, farklılaşmasını, DNA tamirini ve apoptozu kontrol eden genlerde meydana gelen mutasyonlar kansere neden olmaktadır (47). Kansere neden olan genler;

1-Tümör Baskılayıcı Genler

2-DNA Tamir Genleri

3-Onkogenler olarak üç ana gruba ayrılabilirler (24,71).

2.1.2.1. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen ve apoptoz sürecini başlatan genlerdir. Normal hücrelerde tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan proteinler, DNA hasarına ya da dış çevreden gelen büyümeyi baskılayan sinyallere yanıt olarak hücre döngüsü sürecini durdurabilmektedirler. Tümör baskılayıcı genler mutasyona uğradıklarında ya da inaktive olduklarında hücreler, hücre döngüsü kontrol noktalarına yanıt verme ya da DNA hasarı arttığında hücreyi ölüm programına geçirme yeteneklerini kaybederler. Tümör baskılayıcı genlerin etkisini

ytirmesi için her iki allelinin de fonksiyonunu kaybetmesi gerekir. Tümör baskılayıcı bir genin her iki alleli de inaktive olduğunda, hücrenin büyümesi ve bölünmesi devam eder ve hücre kanserleşme sürecine girer (71).

2.1.2.2. DNA Tamir Genleri

Genom DNA hasarına neden olabilecek sayısız etmene maruz kalır. Birçok mekanizma DNA hasarının onarılmasında görev alır. DNA tamir genleri hasar onarımının büyük bir bölümünden sorumludur. DNA tamir genlerinde meydana gelen mutasyonlar protoonkogen ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyon sıklığını arttıracığından, kanserleşmenin biyolojik mekanizmasında çok önemli yer tutmaktadır. Genomda zincirleme mutasyonlarla kansere karşı genetik bir eğilim doğmaktadır (71).

2.1.2.3. Onkogenler

Protoonkogenler, hücrenin normal döngüsünü denetleyen sinyal yollarında, hücre çoğalmasının ve sağkalımının denetlenmesinde görev alırlar (51, 71). Onkogenler ise protoonkogenlerin mutant formlarıdır. Mutasyonlarla meydana gelen fonksiyon değişimleri ile hücre bölünmesi ve proliferasyonunun anormal artışına yol açarlar. Onkogenler hücresele seviyede baskın etkiye sahiptirler. Bu genlerin tek bir allelindeki mutasyon hücre fenotipinin değişmesi için yeterlidir. Hücre bölünmesini uyararak tümör oluşumuna neden olurlar (24,61).

2.1.3. Kanser ve Epigenetik

Epigenetik terimi, genetik bilginin aksine gen dizisi ile ilişkili değildir. Başka bir deyişle, gen fonksiyonlarında meydana gelen mitotik, mayotik, kalıtsal değişimlerdir ve DNA dizisinde meydana gelen değişimlerle açıklanamazlar (44).

Epigenetik değişimler genlerin susturulmasına neden olurlar. Bu da geni inaktive edici bir mutasyon veya delesyon gibi genetik bir mekanizmaya eşdeğerdir. Ancak epigenetik değişimler geri dönüşümlü oluşları ve DNA'nın baz dizisinde bir değişime neden olmamaları gibi özellikleriyle genetik değişimlerden ayrılırlar (34).

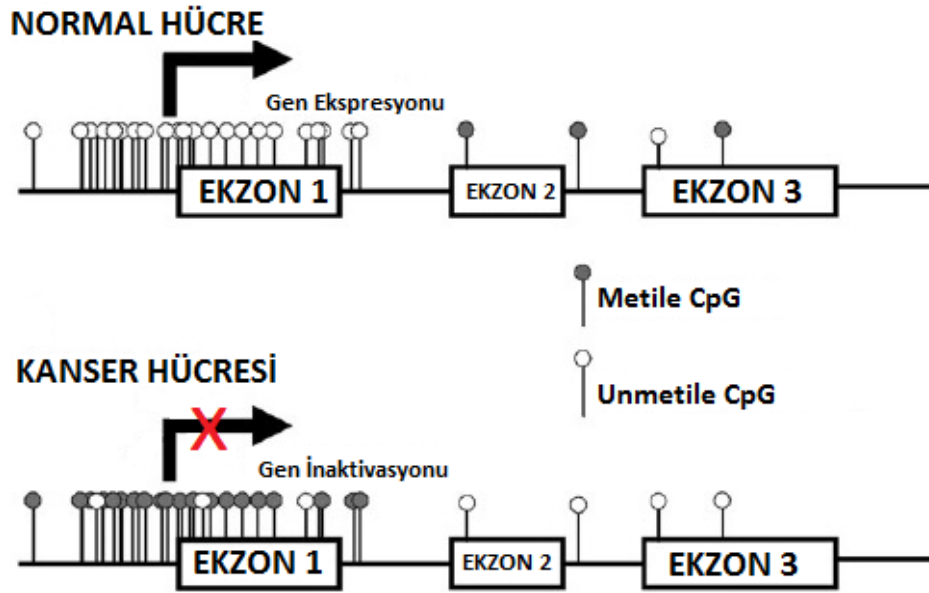
CpG dinükleotidlerinde gözlenen DNA metilasyonu, memelilerdeki epigenetik değişikliklerin başında gelir. İlk kez 1950 yılında keşfedilen 5-metilsitozin, modifiye bir bazdır ve genomdaki bazların yaklaşık %4'ünü oluşturur. Metile CpG dinükleotidlerinin çoğu; sentromerik tekrarlar, satellit dizileri gibi dizilerde yer alırlar. Tüm genomun yaklaşık %2'sini ve CpG'lerin yaklaşık %15'ini oluşturan CpG adacıkları ise; 0,2-1kb uzunluktadır ve insan genomundaki genlerin yaklaşık %50'sinin promotor bölgelerinde bulunurlar (4).

Normal hücrelerde gözlenen promotor bölge metilasyonunun hücre farklılaşmasında, dokuya özgü genlerin ekspresyonunu düzenleyerek etkili olduğu bilinmektedir (56). Kanseri hücrelerinde, genomda genel hipometilasyonun yanı sıra, bazı tümör baskılayıcı, hücre döngüsünü kontrol eden ve apoptozu önleyen, DNA onarımında görevli ve gelişim sürecinde etkili yolların normal işlemlerini sağlayan genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarında aşırı metilasyon gözlenmektedir. CpG adacık metilasyonunun, o genin transkripsiyonunu önlediği ve karsinogenezde rol oynadığı bilinmektedir (26, 70).

2.1.3.1. Promotor Bölge Aşırı Metilasyonunun Kanseri Oluşumundaki Rolü

Kanseri hücrelerinde gen inaktivasyonu mekanizması olarak promotor bölge aşırı metilasyonu; sonraki kuşaklara aktarılabilmesi, ilgili gende, kodlayan bölgede mutasyon olmaksızın genin ifadesini baskılayabilmesi, gen ifadesini baskılamada, kodlayan bölge mutasyonları ile aynı etkinlikte olması ile önem taşımaktadır (26, 70).

Promotor bölgesi aşırı metilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin promotora bağlanmasını önler. Bağlanmayı doğrudan engelleyeceği gibi dolaylı olarak, metilsitozine bağlanan proteinleri bölgeye çekerek de gerçekleştirebilir. Doğrudan baskılamada 5-metilsitozin'deki metil grubu, DNA'nın büyük oluğuna doğru çıkıntı yaparak tanıma bölgesini tanınmaz hale getirir. Dolaylı yolda, promotora bağlanacak transkripsiyon faktörlerinin tanıyacağı bölgeler, metilsitozine bağlanan proteinlerle maskelenir. Bu yollarla genin susturulmasına sebep olur (Şekil 2.1). Bu etkilerin dışında biyokimyasal olarak metil grubu eklenmesinin, 5-metilsitozin'in yüksek polaritesi nedeniyle, RNA polimerazların daha yüksek enerji ile transkripsiyon başlangıç noktasına ulaşabilmesine yol açtığı ve bu şekilde genin ifadesini baskıladığı düşünülmektedir (4).



Şekil 2.1. Normal ve Kanserli Hücrede CpG Metilasyonunun Gen Ekspresyonuna Etkisi
(21. kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

CpG adacıklarının metilasyon derecesi, farklı tümör tiplerinde değişebildiği gibi aynı tümör tipine sahip kişilerde de, çevresel etmenlere, genetik yatkınlığa ve epigenetik kontrolü etkileyen tümörün evresi ve histopatolojik derecesi gibi faktörlere bağlı olarak farklılık gösterir. Metilasyon seviyesi tümöre ve gene özgüdür. Ayrıca CpG

adacıklarının metilasyonu rastgele gerçekleşmemekle birlikte bazı bölgelerde 'de novo' metilasyona yatkınlık görülmektedir. Kansere özgü metilasyon kalıpları işlevsel ya da yapısal nedenlerden kaynaklanabilir (4).

2.1.3.2. Tümör Belirteci Olarak DNA Metilasyonu

Kanser hücrelerindeki metilasyon değişiklikleri doku ve tümör tipine özgü olmalarının verdiği avantajla kanserin teşhisi ve sınıflandırmasında önemli yere sahiptir. Aşırı metile promotor bölgelerinin tümör belirteci olarak kullanımı pek çok yönden uygundur. Kanser türlerinin çoğunda, CpG adacığın aşırı metilasyonu tümör tipine özgü izlenmektedir. Ayrıca, promotor aşırı metilasyonu kanserlerin erken dönemlerinde olduğu için hastaya erken tanı konmasına da olanak sağlamaktadır (58, 75).

Metilasyon değişiklikleri, tümör bölgesi dışında da saptanabilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar kan hücreleri metilasyonunun ve kolon, mesane, meme, mide kanserleri gibi birçok kanserle ilişkisi olduğunu göstermiştir (65). Farklı tümör tiplerinde metile olan genlere bakıldığında, bazı genlerin ortak olduğu gözlenmiştir. Bu özellik pek çok kanser türü için aynı genlerin metilasyon derecelerine bakılarak kanser tarama metodlarının geliştirilmesine olanak tanır (49).

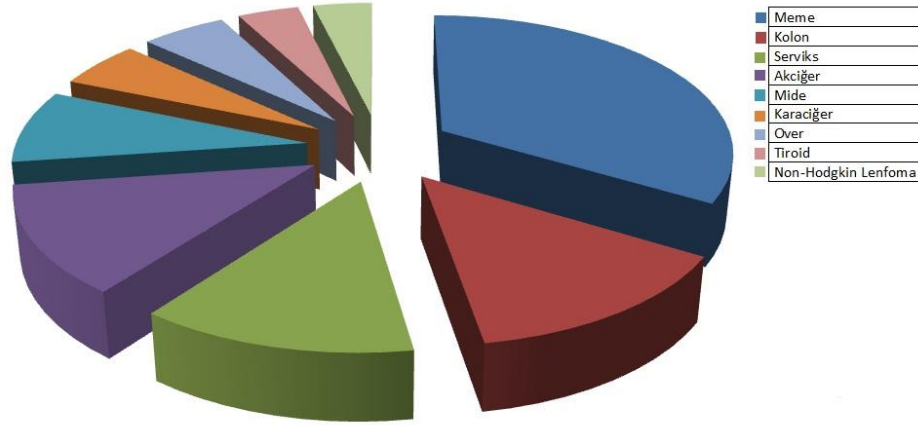
2.2. MEME KANSERİ

2.2.1.Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Dünya çapında meme kanseri; tüm cinsiyetlerde, akciğer kanserinden sonra ikinci en yaygın kanser türüdür (33). Yapılan araştırmaya göre 20-59 yaş arası kadınlarda kanser nedenli ölümlerin birinci nedeni ve tüm kadınlarda kanser nedenli ölümlerin ikinci nedenidir (79). Uluslararası Kanser Araştırmaları Derneği (International Agency for Research on Cancer) GLOBOCAN projesinin verilerine göre 2008 yılında toplam

yaklaşık 12.7 milyon kanser vakası teşhis edilmiş ve 7.6 milyon kanser nedeni ölüm meydana gelmiştir (33).

En sık tanı konan kanserler sırasıyla akciğer (1.35 milyon), meme (1.15 milyon) ve kolorektal kanserlerdir (1 milyon). Boyle ve ark. , 40 Avrupa ülkesindeki kanser insidansı ve mortalitesini değerlendirdikleri çalışmalarında, kadınlardaki meme kanseri insidansının akciğer ve kolorektal kanserden sonra %12,8'lik bir oranla üçüncü sırada olduğunu göstermişlerdir. Dünya çapında meme kanseri kadınlarda en sık tanı alan kanser türüdür (Şekil 2.2) (8, 33).



Şekil 2.2. 2008 Yılında Kadınlarda Kanser Nedenli Ölümlerin Miktar Grafiği (33. kaynağın verilerine göre hazırlanmıştır)

Ülkemizde tüm kanserlerin %24,1'ini meme kanserlerinin oluşturduğu belirtilmektedir. Türkiye'de 1999 yılında 8.879 olan meme kanserli kadın sayısı, 2003 yılında 12.772'ye yükselmiştir. (27).

2.2.2. Meme Kanseri Etiyolojisi

Meme kanseri genetik, epigenetik değişiklikler ve çevre faktörlerinin etkisi ile ortaya çıkar (79). Çok aşamalı tümör gelişiminin klasik modelinde, ilk olarak normal bir

epitelyum hücresi premalignant atipik hücreye dönüşür. Daha sonra hücrenin klonal büyümesi ve gelişmesi sonucu premalignant lezyon oluşur. Bir süre sonra lezyon invaziv hale gelir. Vücuda yayılmaya başlar, immün sistemin etkisinden kurtulduktan sonra metastaz yapar. İnvaziv meme kanserine doğru ilerlemeyi haber veren biyolojik ve genetik anormalliklerin tanımlanması ile çok aşamalı kanser gelişimi modeli oluşur (68).

Meme kanserlerinin yaklaşık %20'si lobül adı da verilen süt bezlerinden, %80'i ise lobüllerle meme ucunu birbirine bağlayan meme kanallarından köken almaktadır. En sık rastlanan duktal karsinoma, memenin süt kanallarında başlar. Meme kanseri memenin dışına yayıldığında koltuk altındaki lenfatik nodüller en sık görülen yayılım yerleridir (12).

2.2.2.1. Genetik Faktörler

Meme kanseri oluşumuyla ilgili genetik değişiklikler arasında bazı genlerin amplifikasyonu, delesyonları, nokta mutasyonları, epigenetik değişiklikler ve kromozomların yeniden düzenlenmeleri ve anöploidiler yer alır (37). Yapılan çalışmalarda meme kanserlerinin oluşumunda birçok onkogen, tümör baskılayıcı gen ve DNA tamir genlerinin sorumlu olduğu gösterilmiştir.

2.2.2.1.1. Meme Kanserinde Etkili Olan Onkogenler

Protoonkogenler, hücre büyümesi ve bölünmesinden sorumlu normal hücresel işlevi olan genlerdir. Protoonkogenlerin mutasyona uğramasıyla kanserleşmeden sorumlu olan onkogenler oluşur. Meme kanseri oluşumunda siklin, c-myc, c-fos, cmyb, c-jun, Rar α , bcl-1, H-ras gibi onkogenlerin rolü olduğu gösterilmiştir (16).

Meme kanserinde en sık görülen değişikliklerden biri c-myc geninin amplifikasyonudur. Ancak c-myc geni tarafından kodlanan proteinin yarı ömrünün çok kısa olması hastaların yaklaşık üçte birinde gözlenen bu değişikliğin izlenmesini güçleştirir (45).

2.2.2.1.2. Meme Kanserinde Etkili Olan Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler hücre çoğalmasını baskılayan genlerdir. Meme kanserlerinin yaklaşık %10-15'i kalıtsaldır ve bu kanserlerin oluşumuna tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar yol açmaktadır (29). Kalıtsal meme kanserli kadınların ortalama yarısında BRCA1 geninde, 1/3'ünde de BRCA2 geninde mutasyon görülür (76). Ayrıca TP53, PTEN, p16 (MTS1), RB1, DCC, CHEK2, ATM, FOXP1 gibi tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonların da kalıtsal meme kanserine yol açtıkları gösterilmiştir (29).

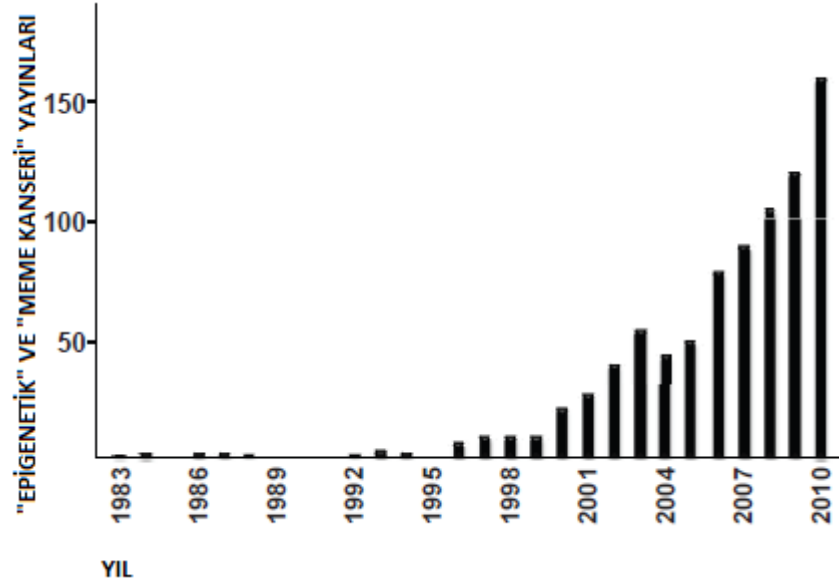
2.2.2.1.3. Meme Kanserinde Etkili Olan DNA Tamir Genleri

Son yıllarda akciğer, baş-boyun, meme kanserleri ve glioblastomalarda DNA tamir genlerinin mutasyonlarının sorumlu olduğu yapılan çalışmalarla gözlenmiştir (77). Yapılan moleküler genetik çalışmalarda meme kanserinin oluşumunda önemli rol oynayan BRCA1 ve BRCA2 tümör baskılayıcı genlerinin aynı zamanda DNA'nın tamirinde de rol oynadığı gösterilmiştir. Meme kanserinin oluşumunda BRCA1 ve BRCA2 genlerinin rolü büyük olmakla beraber NBS1, RAD51, PTEN ve BAP1 gibi bazı genlerin de etkili olduğu bilinmektedir (7).

2.2.2.2. Epigenetik Faktörler

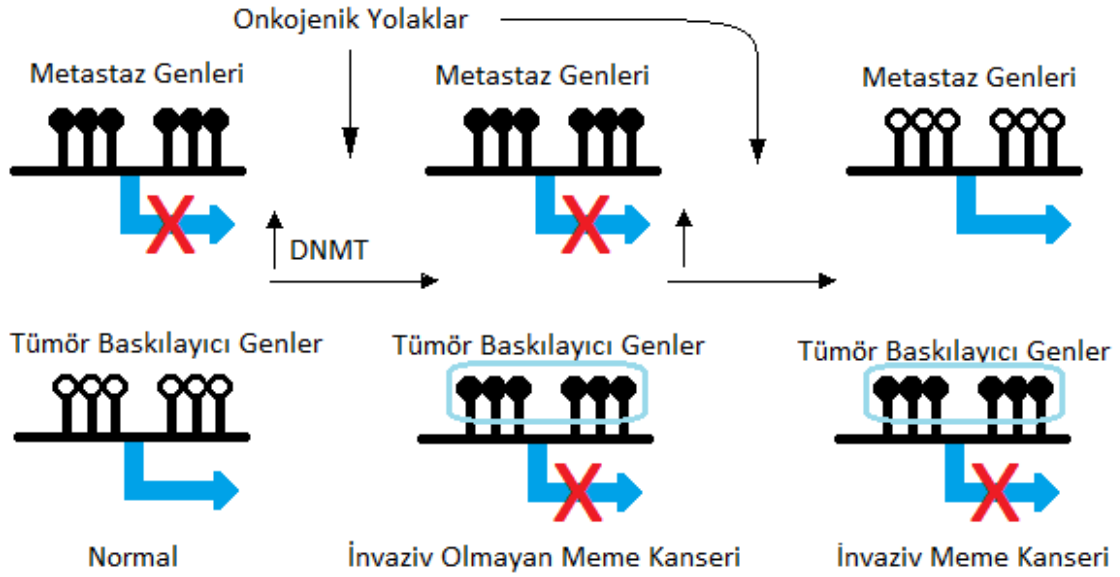
Son yıllarda meme kanseri ve epigenetik üzerine yapılan çalışmaların sayısı oldukça artmıştır (Şekil 2.3) (28). Çalışmalar arttıkça meme kanseri ve epigenetik

anomaliler arasındaki ilişki daha net anlaşılmaya başlanmıştır. Meme kanseri tanı ve tedavisinde epigenetik faktörlerin kullanılması gerekliliği önem kazanmaktadır.



Şekil 2.3. Epigenetik ve Meme Kanseri Alanındaki Çalışmaların Artışı (28. kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

Normal hücrelerde tümör baskılayıcı genler aktif halde olup metilasyon gözlenmez. Metastaz genleri metile olup inaktiftirler. DNA metil transferaz ile (DNMT) DNA’da oluşan metilasyon sonucu tümör baskılayıcı ve metastaz genleri metillenir ve invaziv olmayan meme kanseri oluşur. Farklı bir onkogenik yolağın demetilasyon aktivitesine neden olması durumunda ise invaziv meme kanserlerinin oluşumunu sağlamaktadır (Şekil 2.4) (63).



Şekil 2.4. Meme Kanseri Gelişiminde Metilasyonun Rolü (63. kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

2.2.2.3. Endokrin faktörler

Günümüzde immunohistokimyasal yöntemler steroid reseptör durumunun belirlenmesinde standart olarak kullanılır. Meme kanserinin tanısında ve tedavisinde steroid reseptörler arasında östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) özellikle dikkat çekmektedir. Çünkü bu reseptörlerin protein seviyeleri meme tümörlerinde normal dokulardakinin aksine artış göstermektedir (50, 60). Khan ve ark. yüksek reseptör ifadenmesinin normal meme epitelinde, kanser riskini arttırabileceğini ileri sürmüştür. Östrojen ve progesteronun meme kanseri riskini arttırdığı bilinmektedir (35,48).

Meme kanserinde kullanılan en güçlü tanı faktörü ER durumudur. Reseptör pozitif tümörler, hormonal tedaviye daha iyi cevap vermekte ve daha iyi prognoz göstermektedir. Östrojen reseptörünün, ER α ve ER β olmak üzere 2 tipi bulunmaktadır. ER α , tüm meme kanserlerinin %70'inde ifadenmekte olmasına rağmen prediktif

değeri ideal değildir. ER pozitif metastatik meme kanserlerinin yaklaşık olarak 1/3'ü hormonal tedaviye cevap vermemektedir (50).

2.2.2.4. Çevresel Faktörler

Meme kanseri gelişme riski, yaş ile doğrudan ilişkili olup, yaş arttıkça hastalık görülme sıklığı giderek artmaktadır. Meme kanseri görülme riski 30 yaşından önce az olup, bu yaşı takip eden reproduktif yıllarda hızlı bir tırmanış gösterir; menopoz dönemindeki hafif bir azalmayı takiben de menopoz sonrası yıllarda yavaş eğimle sürekli devam eden bir artış ortaya çıkar (66).

Alkol bağımlılığı, menstruasyonun uzun yıllar devam etmesi, menarşın 12 yaşından önce başlaması, puberte esnasında ya da sonrasında iyonize radyasyona maruz kalmak ve hayvansal yağlardan zengin diyet meme kanseri riskini artırır. Sigara kullanımı ile meme kanseri arasında ilişki kurulamamıştır (14).

2.2.3. Ailesel ve Sporadik Meme Kanseri

Meme kanserinin büyük çoğunluğu sporadik vakalar olmasına rağmen yaklaşık %5-10 oranında kalıtsal nedenli ailesel meme kanseri ortaya çıkmaktadır. Meme kanseri oluşumuna birçok gen etki eder ancak kalıtsal meme kanserlerinden sorumlu olarak, özellikle genom devamlılığının koruyuculuğunda iş gören proteinleri üreten bazı genlerin germ hücrelerindeki mutasyonları gösterilmiştir. Bir kadının meme kanserine yakalanma riski birinci derece yakınlarında etkilenmiş bireyin olması durumunda üç kata kadar, birden fazla etkilenmiş birinci dereceden yakınlarının varlığında ise on kata kadar arttığı bilinmektedir. Ailesel meme kanserinin özellikleri arasında ailede birden fazla etkilenen birey olması, erken başlangıç yaşı ve memenin iki taraflı tutulumu sayılabilir (47).

Kalıtsal meme kanserinde nadir gözlenen yüksek penetransa sahip meme kanserine yatkınlık genleri olarak BRCA1 ve BRCA2 genleri bulunmuştur. Bu genlerdeki germ hücre soyu mutasyonlarını içeren kadınların yaşamlarının bir döneminde meme kanseri geliştirme riski %50-80 arasında değişmektedir. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germ soyu mutasyonları, yüksek penetransa sahip ve hastalık için yüksek risk oluşturan faktörler olarak birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu iki kansere yatkınlık genlerinin germ hücrelerindeki mutasyonları ovaryum kanserlerinde %10, meme kanserlerinde %7 oranında dominant olarak kalıtım gösterir. Halen ailesel meme kanseri için en şiddetli etkiye sahip mutasyonları taşıyan bu iki gen, meme kanseri risk tespitinde mutasyon analizlerinin yapılmasında ön sırada yer almaktadır (18, 70, 81).

Aile öyküsü olmayan sporadik meme kanserli hastalarda da BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları saptanmıştır. Bazı olgulardaki mutasyonlar yapısaldir ve aile öyküsü yoktur. Ancak yapılan analizlerde BRCA1 ve BRCA2'nin olduğu alleldeki somatik mutasyonlar ile birlikte normal allelin kaybı (heterozigosite kaybı, LOH) gözlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, özellikle BRCA1 geninin sporadik meme kanseri vakalarında inaktive olduğu ve mutasyonlarının meme kanseri oluşumunda rolü olduğu gösterilmiştir (79).

2.2.4. BRCA1 Geni

BRCA1 geni, 17. kromozomun 17q21 bölgesinde lokalizedir (46). DNA tamiri, hücre döngüsü kontrol noktaları, protein ubiquitinasyonu ve kromatin oluşumunda görev alan multifonksiyonel bir proteini kodlar (40). 24 ekzonlu bu gen tümör baskılayıcı gen olarak varsayılır ve genomik DNA'nın 100kb'lık bölümünü oluşturur. İlk olarak Miki ve ark. tarafından 1994 yılında ailesel meme kanserlerinden sorumlu gen olduğu ortaya atılmıştır (42).

2.2.4.1.BRCA1 Proteini

BRCA1 geninin ürünü olan 1863 amino asidin oluşturduğu 220 kDa'lık BRCA1 proteini, hücre nükleusunda lokalizedir ve hücre döngüsüne bağlı olarak fosforile durumda bulunmaktadır (42). Çekirdekteki ekspresyonu ve fosforilasyonu, hücre döngüsünün S fazına girerken artar ve mitoz esnasında en yüksek seviyeye ulaşır. BRCA1 ekspresyonu ubiquitinasyon yoluyla ve proteazoma bağlı yıkımla azalır. BRCA1 proteini, N terminalinde yaklaşık 100 aminoasitlik özel bir RING bölgesi ve C terminalinde ise yaklaşık 90 aminoasitlik BRCT tekrar bölgeleri içermektedir (Şekil 2.5). BRCA1' in tümör baskılayıcı özelliğinde bu iki fonksiyonel bölgenin önemi dikkat çekmektedir (30, 38).



Şekil 2.5. BRCA1 Proteini (81. kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

2.2.4.1.1. RING Bölgesi

BRCA1 proteinin N terminal bölgesine bitişik çinko (Zn) parmak (zinc finger) dizisi vardır. Bu dizi sistein ve histidin rezidüleri içerir ve RING domaini olarak bilinir. Tam olarak tanımlanmış bir fonksiyonu olmamasına rağmen bu bölgenin DNA ile etkileşimde olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca heterokromatin korunması, spermatogenez ile ilgili görevleri olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (25).

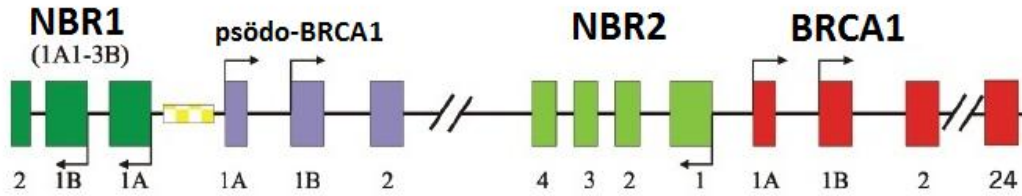
2.2.4.1.2. BRCT bölgesi

BRCA1 C terminal (BRCT) bölgesi DNA hasar cevabında integral sinyal modülüdür. Kanıtlanmış fosfo-peptid bağlanma bölgesi rollerinden başka, BRCT bölgeleri fosforilasyondan bağımsız protein etkileşimleri, DNA bağlanma ve poli (ADP-riboz) polimeraz bağlanma görevleri vardır (11).

BRCA1'in BRCT bölgesindeki kanser oluşturan mutasyonlar ve kötü huylu polimorfizmler, transkripsiyonel aktivasyonunu kaybetmesiyle birlikte RNA polimeraz II bağlama yeteneğinin kaybedilmesine neden olmaktadır (11, 80).

2.2.4.2. BRCA1 Promotoru

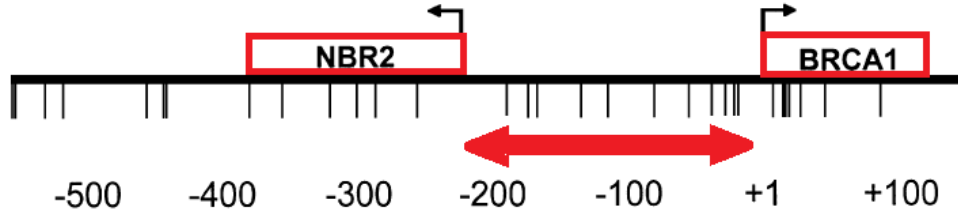
İnsan BRCA1 lokusunun yapısı karmaşıktır, bir psödo-BRCA1 geni ve iki ayrı geni (NBR1 ve NBR2) oluşturan parsiyel duplikasyonlar içerir (Şekil 2.6) (43). BRCA1 ve NBR2 genleri 200 baz çiftinden daha az farkla birbirinden ayrılır (Şekil 2.7). Bu bölge majör meme-spesifik transkripsiyon başlama bölgesi için ilkin promotordur ve BRCA1'in 1A ekzonunun içindedir (46).



Şekil 2.6. BRCA1 Geni Lokusu (43. kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

Yapılan ilk çalışmalarda BRCA1 promotorunda başlangıç noktasının 200 baz çifti yukarısında (upstream) olası bir “upstream baskılayıcı element” ve bir pozitif element

olduğu saptanmıştır (Şekil 2.7). Bu bölge hem BRCA1 hem de NBR2 yönünde direkt ekspresyon yapabilme yeteneğindedir, yani iki yönlü transkripsiyon elementi gibi fonksiyon gösterir (62, 78).



Şekil 2.7. BRCA1 Promotor Bölgesi (54. kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

NBR2 ve BRCA1 genlerinin aslında resiprokal olarak düzenlendiğine dair kanıtlar vardır. Birkaç hücre serisinde NBR2'nin ekspresyon seviyesinin yüksekliği, BRCA1 seviyesinin düşüklüğü ile birlikte gözlenmiştir. Bu promotorların RNA polimeraz II için yarış halinde olduklarını gösterir, aynı zamanda NBR2'nin aktivasyonu düşük BRCA1 ekspresyonuna neden olduğu söylenmektedir (43).

2.2.4.3. BRCA1 Fonksiyonu

Hücre büyüme kontrolü ve nükleer fonksiyonlarda çeşitli dokularda görev alan BRCA1 proteini birçok fonksiyonel bölgeye sahiptir. Önemli biyolojik yollarda sayısız karmaşık proteinle etkileşen büyük bir proteindir (81). İyonize radyasyon ya da X-ray ışınları ile ortaya çıkabilen çift zincir kırıklarının homolog tamirinde ve genotoksik homolog olmayan son birleşmesi (Non-Homologous End-Joining, NHEJ) tamir yolağında rol alır. Bu çift zincir kırıkları doğal radyasyon veya diğer mutajenik ajanlara maruziyetten kaynaklanacağı gibi kromozomlardaki genetik materyali değişimlerinin olduğu esnarlarda da (kross-over, homolog rekombinasyon) gerçekleşebilir. BRCA1 geninin kodladığı protein, diğer tümör baskılayıcılar, DNA hasar sensörleri, sinyal

dönüştürücülerle etkileşerek BASC (BRCA1 ilişkili genom gözetim kompleksi, BRCA1 associated genom surveillance kompleks) oluşturur. DNA hasarı oluştuğunda BASC kompleksi BRCT bölgesine bağlanır ve DNA tamir edici diğer protein ve enzimler için liman görevi görür. Tamir edildikten sonra ayrılır (9, 11, 80). BRCA1'e bağlı homolog tamirin yokluğunda kırık kromozomlar duplikasyonlar, delesyonlar ve translokasyonlar oluşturur. Moleküler düzeyde genomik instabilite fonksiyon kazanım/kayıpları ile hücre büyümesi kontrolünde önemli rol oynar (81).

Rekombinasyonel tamir, hasarlı DNA'nın diğer bir hasarsız moleküle rekombinasyonu temeline dayanır. Bu mekanizma DNA replikasyonu sırasında karşılaşılan ve normal replikatif DNA polimerazlar ile kopyalanamayan bir replikasyon çatalının ilerlemesini bloke eden, timin dimerlerinin veya çift DNA kırıklıklarının bulunduğu hasarların onarımında sıklıkla kullanılır. Kalıtsal meme kanserinden sorumlu olan genlerin özellikle BRCA1 ve BRCA2'nin kodladığı proteinlerin homolog rekombinasyon ile çift iplik kırıklarının onarımında görevli olmaları, bu DNA onarımındaki bozukluğun, kadınlarda en yaygın kanserlerden birisinin gelişimine yol açabileceğini göstermektedir (9, 81, 82).

BRCA1 genom içeriğinin bütünlüğü için gerekli olması nedeniyle "caretaker" tümör baskılayıcı gen olarak sınıflandırılmıştır. Amino asit dizisinin C terminali (BRCT) transkripsiyonu aktive edebilir ve DNA hasarından sonra hücre döngüsünü arreste sokan genlerin transkripsiyonu düzenler (9).

2.2.4.4. BRCA1 ve Epigenetik

BRCA1 mutasyonları ailesel meme kanserlerinin neredeyse yarısından sorumlu olmasına rağmen, sporadik meme ve over kanserlerinde nadir olarak saptanmıştır. Ancak BRCA1 ekspresyonu sporadik meme kanserlerinde belirgin olarak indirgenmiş olduğu saptanmıştır ve bu da BRCA1 ekspresyonunun nokta mutasyonlarından farklı mekanizmalar tarafından indirgenmiş olduğunu gösterir (46).

Ailesel olmayan tümörlerin gelişiminde BRCA1'in bir faktör olduğuna dair birçok belirtiler vardır. Genetik mutasyonlara alternatif mekanizmalar olarak BRCA1'in aşırı metilasyonu 1997 yılında Dobrovic ve Simpfendorfer ilk olarak sporadik meme kanserlerinde göstermiştir (15). Mancini ve ark. BRCA1'in CpG metilasyonunun tümör spesifik olduğunu ve BRCA1 promotorundaki ekzon 1A bölgesindeki metilasyon sensitif CRE bağlanma bölgesinde gerçekleştiğini yayınlamıştır (39). Bu bulgular, sporadik meme kanserlerindeki düşük BRCA1 ekspresyonunun, BRCA1 geninin promotor bölgesindeki CpG metilasyonu ile down-regüle olduğunu öne sürmüştür. Ancak BRCA1'in aşırı metilasyon ile inaktivasyonunun ortaya çıkışı hala tartışma konusudur (46).

Aşırı metilasyon BRCA1 mRNA seviyesinin düşmesi ile fonksiyonel olarak ilişkili olduğu düşünülmektedir. Anormal promotor aşırı metilasyonun transkripsiyonel baskılanmanın başlamasının nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu hala cevabı verilememiş önemli bir sorudur. Heterozigosite kaybı durumunda, aşırı metilasyon epigenetik bir ikinci vuruş olarak kalan yabancıl tip BRCA1 allelini inaktive eder. Anormal promotor aşırı metilasyonu BRCA1 ekspresyonunun önemli bir baskılayıcısıdır, ancak sporadik tümörlerin çok büyük olmayan bir kısmında meydana geldiğini de belirtilmelidir (41).

2.2.5. Meme Kanserinde Evreleme

2.2.5.1. Histolojik Tipleri

Histolojik olarak meme kanserleri in situ ve invaziv kanserler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Erken evrede bir tümörün, meme içinde henüz oluştuğu yerle sınırlı olması in situ veya noninvaziv, kanser hücreleri çevredeki bazal hücreleri aştığı zaman invaziv olarak tanımlanır. İnvaziv kanserler, lenf ve kan damarlarına yayılarak bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilme özelliğine sahiptir.

İnvaziv meme kanserleri morfolojik olarak birbirinden farklı fenotipik özellikler gösterebilir. Bunların bazılarının klinik ve prognostik açıdan karakteristik özellikleri bulunur. Histopatolojik sınıflamada, tümör hücrelerinin sitolojik özellikleri yanı sıra oluşturdukları yapısal özellikleri de göz önüne alınmaktadır. Günümüzde meme kanseri için kullanılan sınıflama Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen sınıflamadır (Tablo 2.1) (12, 20, 64).

Tablo 2.1. Dünya Sağlık Örgütü Meme Kanseri Sınıflandırması (64)

1. In situ karsinoma	<ul style="list-style-type: none">• In situ duktal karsinoma• In situ lobuler karsinoma
2. İnvaziv karsinoma	<ul style="list-style-type: none">• İnvaziv duktal karsinoma• İnvaziv lobuler karsinoma• Tubuler karsinoma• İnvaziv kribriform karsinoma• Medüller karsinoma• Müsinöz karsinoma• İnvaziv papiller karsinoma• İnvaziv mikropapiller karsinoma• Apokrin karsinoma• Sekretuar (juvenil) karsinoma• Adenoid kistik karsinoma• Metaplastik karsinoma• Nöroendokrin karsinoma• İnflamatuar karsinoma

2.2.5.2. Histolojik Derece

Günümüzde morfolojik tiplerine bakılmaksızın invaziv karsinomların tümünün derecelenmesi önerilmektedir. En çok kullanılan dereceleme sistemi Bloom-Richardson sistemidir. Bu dereceleme sisteminde tümör hücrelerinin; çekirdeğinin özellikleri, oluşturdukları tübüler yapıların oranı ve mitoz sayısı ayrı ayrı hesaplanarak elde edilen toplam skora göre derece belirlenmektedir (Tablo 2.2). On yıllık sağkalım oranı; derece I tümörler için %85, derece II tümörler için %60, derece III tümörler için %15'dir (3, 31).

Tablo 2.2. Histolojik Derecelemede Kullanılan Bloom-Richardson Sistemi (31)

	Skor (puan)
Tübüler tümör oluşumu <ul style="list-style-type: none">• Tümörlerin büyük kısmında(>%75)• Orta derecede (%10-75)• Minimal veya hiç yok (<%10)	1 2 3
Nükleus özellikleri <ul style="list-style-type: none">• Küçük, hepsi aynı biçimde hücreler• Orta derecede boyut ve şekil farkı, nükleolus varlığı• Belirgin boyut ve şekil farkı, sıklıkla çok sayıda nükleolus	1 2 3
Mitoz sayısı (x25, alan çapı 0.59mm-10 alan) <ul style="list-style-type: none">• 0-9• 10-19• >20	1 2 3

(Toplam skor; 3-5: derece 1, 6-7: derece 2, 8-9: derece)

2.3. Methylation Sensitive-High Resolution Melting (MS-HRM)

Yüksek çözünürlüklü erime eğrisi (high resolution melting, HRM) analizi metilasyon taramak için hassas ve spesifik bir metoddur. Temelinde HRM olan Metilasyon Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM) yönteminde metilasyon profili bilinmeyen örnek DNA'nın bisülfite modifikasyonunun ardından, metile ve metile olmayan alleller arasındaki T_m farklılıklarından faydalanılarak anormal DNA metilasyonu saptanabilmektedir. Bisülfite muameleden sonra metile sitozinler değişmeden kalarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) esnasında guaninle eşleşerek 3 hidrojen bağı yapar. Metile olmayan sitozinler modifikasyonla urasile dönüşüm yapar. PZR esnasında timin bazı ile eşleşme gerçekleşir. Metile olmayan DNA A-T eşleşmesi ile 2 hidrojen bağına sahip olur. Bu nedenle metile ve metile olmayan DNA'ların PZR ürünleri HRM'de termal denatürasyon esnasında çift zincirli DNA'ya bağlanabilme yeteneğine sahip floresan boyalar ile farklı erime profilleri gösterir. Boya çift zincirli DNA'ya bağlandığında floresan değişimi hem PCR boyunca DNA konsantrasyonunun artışı hem de HRM boyunca ısıyla indüklenmiş DNA'nın ayrılmasını ölçer. Erime eğrisi analizinde başlangıçta floresan yüksektir. Çünkü örnek çift zincirli DNA olarak tepkimeye başlar. Fakat yükselen ısıyla birlikte floresan azalır ve DNA tek zincirli hale geçer. Gözlemlenen erime karakteri her DNA örneği için karakteristiktir (72, 74).

Metilasyon durumunun analizi için kullanılan yöntemler içinde MS-HRM hızlı, güvenilir, çalışılan bölgeye özgü, maliyeti düşük, düşük seviyedeki metilasyon seviyelerini ölçebilen bir teknik olması ile diğer yöntemlerden ayrılır. Yüksek sensitiviteli ve hızlı çalışılabilen bir yöntemdir. Metile olmayan DNA'nın arka planında kalan %1'lik metile DNA'yı saptayabilmektedir (72, 74).

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada sporadik meme kanseri tanısı almış ve BRCA1 gen mutasyonu olmayan olguların tümör ve periferik kanlarında BRCA1 gen metilasyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.1.Hasta Grubu

Çalışmamıza İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında meme kanseri tanısı almış otuz olgunun periferik kan ve tümörlü doku örnekleri dahil edilmiştir. Meme kanserli doku örnekleri operasyon sonrası serum fizyolojik içine alınmış, -80°C’de dondurulmuş ve soğuk zincir ile laboratuvarımıza ulaştırılmıştır. Kan örnekleri EDTA’lı tüp içinde -80°C’de saklanmış ve yine soğuk zincir ile laboratuvarımıza gelmiştir. Ayrıca meme kanseri açısından sağlıklı ve ailesinde meme kanseri öyküsü olmayan otuz kontrol bireyin periferik kan DNA’sı da çalışmamızda kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir. Meme kanserli olguların DNA örneklerinde BRCA1 geninin promotor bölgesindeki metilasyon durumu MS-HRM yöntemiyle incelenmiştir.

3.2.Gereçler

MS-HRM analizlerinde kullanılan cihaz ve sarf malzemeler aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir.

3.2.1. Kullanılan Gereçler

- Manga Pure Compact DNA Ekstraksiyon Robotu (Roche)
- Nanodrop 1000 (peqLab)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf)
- LightCycler 480 real-time PCR (Roche)
- Light cycler 480 Multiwell plate 96 (Roche)
- Thermal cycler (PE GeneAmp PCR System 9700)
- Su banyosu (Nüve)
- Vorteks (Heidolph)
- Deep-freeze (Arçelik)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Mikro pipet takımı (2-20-100-1000 µl) (Gilson)
- 0.2 ml'lik micro amplifikasyon strip tüpü ve kapakları (Greiner bio-one)
- Ependorf Tüpü (1,5 ml'lik)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- DNA İzolasyon Kiti (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I)
- Chemicon Universal Methylated DNA
- Chemicon Universal Unmethylated DNA
- Bisülfite Modifikasyon Kiti (QIAGEN)
- BRCA1 Forward ve Reverse Primer Çifti (Biomers)
- LightCycler ® 480 High Resolution Melting Master kiti (5ml / 500 reaksiyon) (Roche)

PDF Eraser Free

- Proteinaz K (QIAGEN)
- Distile Su
- Ksilol
- %70'lik etil alkol
- %100'lük etil alkol
- Tissue lysis buffer (Roche)
- PBS (phosphate buffered saline, 500 ml distile su içine 4g NaCl, 0.1g KCl, 0.57g Na₂HPO₄.2H₂O, 0.1g KH₂PO₄ eklenerek oluşturulan tampon solüsyonu)
- Parafilm

3.2.3. BRCA1 Geni Metilasyon Analizinde Kullanılan Primerler

BRCA1 geninin promotor bölge aşırı metilasyonunu belirlemek için;

- Metile forward; 5'-TTG TTG AGC GGT AGT TTT TTG GTT-3'
- Metile reverse; 5'- AAC CTA TCC CCC GTC CAA AAA-3'

primerleri kullanılmıştır. Liyofilize halde ve 0.04 µmol sentez skalasında ticari olarak satın alınan BRCA1 metile forward primeri, 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde firmanın önerisi olan 939 µl; BRCA1 metile reverse primeri 814 µl, PCR için uygun saflıktaki steril distile su eklenerek çözülmüştür ve bloklanarak eşit hacimler halinde -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Taze Doku ve Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi

Çalışmamızda taze doku örnekleri ile olgu ve kontrol grubu periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesinde robotik DNA ekstraksiyon sistemi “MagNA Pure Compact” ekstraksiyon robotu ve “MagNA pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit” kitleri kullanılmıştır. Kan örnekleri için robotik sistemdeki üretici firmanın protokolü aynen uygulanırken dokudan DNA izolasyonunda bazı ön işlemler uygulanmıştır.

Taze dokudan DNA elde edilmesi için uygulanan protokol kısaca aşağıda özetlenmiştir;

- Doku örneklerinden 5-10 mg arası küçük parçalar alınmıştır.
- Bisturi yardımıyla yüzey alanını genişletmek amacıyla mekanik parçalama gerçekleştirilmiştir.
- Örnekler eppendorf tüpüne alınarak 500µl PBS eklenmiştir.
- 14.000 rpm’de 10 dakika döndürülmüş ve süpernatantı atılmıştır.
- Eppendorf tüpünde dipte kalan doku üzerine 30µl proteinaz K ve 200µl doku parçalayıcı tampon eklenmiştir.
- Proteinaz K aktivitesi için 56°C’de 2-3 saat çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında 30 dakikada bir vorteks yapılarak homojenizasyon sağlanmıştır.
- Su banyosundan alınan örnekler robotik DNA izolasyon sistemine yüklenmiştir.
- Sample volume 200µl, elution volume 100µl ve “total plasma nucleic acid isolation” programı seçilmiştir.

Kan örnekleri ise doğrudan robotik DNA elde edilmesi sistemine yüklenmiştir. “Sample volume” 200µl, “elution volume” 100µl ve “DNA isolation blood” protokolü seçilmiştir. Örnek tüplerine doldurulan kan örnekleri robot sistemine yüklenmiştir. Robotik sistemde proteinaz K, yıkama solüsyonları ve DNA’yı tutmak için manyetik boncukların ve pipetaj için boş kuyucukların bulunduğu bir kartuş sistemi, pipet uçlarının yerleştirilmesi için tip trayler ve örnek ve elüsyon tüpleri için bir rak bulunmaktadır. Robotik sisteme kartuş ve pipet uçları yerleştirilip örnek ve elüsyon tüpleri koyulduktan sonra bütün işlemleri otomatik gerçekleştirmektedir. İşlem yaklaşık 25 dakika sürmekte ve elde edilen DNA örnekleri -20° C’de saklanmaktadır.

3.3.2. Bisülfıt Dönüşüm İşlemi

Bisülfıt dönüşüm bir DNA dizisinin metilasyon durumunu inceleme aşamasına geçmeden önce metile olan ve metile olmayan sitozinleri birbirinden ayırmak için uygulanan bir aşamadır (72). Bu aşamada hedef DNA’nın sodyum bisülfıt ile inkübasyonu sonucu metile olmayan sitozinler urasile dönüşürken metile sitozinler ise değişmeden kalmaktadır. Dönüşen urasil nükleotidleri PZR’den sonra timine dönüşür.

DNA izolasyon aşaması sonrası elde edilen DNA’ların bisülfıt dönüşüm işlemi için EpiTect ® Bisulfite Kit (48) (Qiagen) kullanılmıştır. Kitin kılavuzunda (EpiTect Bisulfite Handbook 04/2006) 40 µl hacim içinde 1–500 ng DNA ürünleri için önerilen “Düşük konsantrasyon DNA’daki metile olmayan sitozinlerin sodyum bisülfıt dönüşümü” protokolü uygulanmıştır:

- Örneklerimizden elde ettiğimiz DNA’dan 10 µl (20-250 ng DNA) alınmıştır. Alınan örnekler 200 µl’lik PZR strip kuyucuklarına aktarılmıştır.
- Daha sonra DNA ürünü konmuş her strip kuyucuğuna sırasıyla kit içeriğinde bulunan:

- ✓ 10 µl RNAase free water
- ✓ 35 µl DNA product buffer
- ✓ 85 µl Bisülfite mix

konularak termal döngü cihazında üretici firmanın önerdiği şartlar programlanmış ve uygulanmıştır. Termal döngü şartları:

Sıcaklık	Süre	İşlem
95°C	5 dk	Denatürasyon
60°C	25 dk	İnkübasyon
95°C	5 dk	Denatürasyon
60°C	85 dk	İnkübasyon
95°C	5 dk	Denatürasyon
60°C	175 dk	İnkübasyon

- Termal döngü programının ardından karışımların hepsi 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak üzerine 510 µl Loading buffer (BL) eklenerek vorteks ile homojenize edilmiştir.
- Karışım filtreli spin tüplerine aktarılmıştır ve 12000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra son aşamaya kadar DNA filtrede kalacaktır. Filtreler çıkartılmış ve altında kalan artık BL atılmıştır. Filtreler tekrar spin tüplerine yerleştirilmiştir.
- Filtreler üzerine 500 µl "wash buffer" (BW) eklenmiştir. Mikrosantrifüj tüpleri 12000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Filtreler çıkarılarak süzülen sıvı atılmıştır, filtreler tekrar spin tüplerine yerleştirilmiştir.
- Filtreler üzerine 500 µl "desulfonation buffer" (BD) eklenmiştir. Spin tüplerinin kapakları kapalı şekilde 15 dk oda sıcaklığında (15-25°C) inkübasyona bırakılmışlardır.

- İnkübasyon sonrası 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilerek spin filtrelerinden alt tarafa süzülen sıvı dökülmüştür. Mikrosantrifüj tüplerine 500 µl “wash buffer” (BW) eklenmiştir.
- Tüpler 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilerek spin filtresinden alt tarafa süzülen sıvı dökülmüştür. Aynı işlem bir defa daha gerçekleştirilerek filtreler 2 ml’lik toplama tüplerine aktarılmıştır.
- Yeni tüplerdeki filtrelere 20 µl Elution Buffer (EB) filtrenin tam merkezine gelecek şekilde konularak 12000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir.

Bu işlem ile DNA filtreden ayrılıp buffer ile süzülmesi sağlanmıştır. Buffer içindeki bisülfıt dönüşümü gerçekleşen DNA’lar MS-HRM analizinde kullanılmak üzere kapaklı ependorflara aktarılmıştır.

3.3.3. MS-HRM Cihazına Yükleme

Bisülfıt modifikasyon işlemi sonrasında metilasyon durumlarının saptanması için MS-HRM tekniği uygulanmıştır. Bu teknikte modifikasyona tabi tutulan DNA’ların LightCycler 480 RealTime PCR cihazı (Roche) ile PZR amplifikasyonu ve yüksek rezolüsyonlu erime reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Cihazla uyumlu olan “LightCycler® 480 High Resolution Melting Master” kiti kullanılarak PZR amplifikasyonu ve erime eğrisi analizi gerçekleştirilmiştir. Bu algoritmada bilinmeyen PZR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri ile metile olmayanın metile olana oranının bilindiği kontrol PZR ürünlerinin erime sıcaklık eğrileri karşılaştırılmıştır.

Bisülfıt işleminden sonra elde ettiğimiz ürünlerden 10 µl alınarak 96 kuyucuklu cihaz paletine (multiwell plate) konulmuştur. Daha sonra bisülfıt ürünü konmuş her kuyucuğa sırasıyla:

- ✓ 10 µl Master Mix
- ✓ 3 µl Forward primer
- ✓ 3 µl Reverse primer
- ✓ 2,5 µl MgCl₂
- ✓ 1 µl H₂O konularak pipetaj ile homojenize edilmiştir.

Ayrıca örneklerin metilasyon yüzdeleri saptamak için ticari olarak elde edilen %100 metile (Chemicon Universal Methylated DNA) ve metile olmayan (Chemicon Universal Unmethylated DNA) DNA'lardan yararlanılmıştır. Bu DNA'lara bisülfid dönüşüm işlemi uygulandıktan sonra MS-HRM analizinde olgularla karşılaştırmak amacıyla %100 metile, %75 metile, %50 metile, %25 metile, % 5 metile ve %100 metile olmayan referanslar aşağıdaki koşullar sağlanarak hazırlanmışlardır. Referans DNA hazırlıklarında öncelikle aşağıdaki oranları belirtilen karışım hazırlanmıştır.

Master mix	10 µl
Forward primer	3 µl
Reverse primer	3 µl
MgCl₂	2,5 µl
H₂O	1 µl

Bu karışıma;

- **%100 metile kontrol için** 10 µl %100 metile kontrol DNA,
- **%75 metile kontrol için** 10 µl %75 metile (7,5 µl %100 metile kontrol DNA+2,5 µl %100 metile olmayan kontrol DNA) kontrol DNA,
- **%50 metile kontrol için** 10 µl %50 metile (5 µl %100 metile kontrol DNA+5 µl %100 metile olmayan kontrol DNA) kontrol DNA,

- **%25 metile kontrol için** 10 µl %25 metile (2,5 µl %100 metile kontrol DNA+7,5 µl %100 metile olmayan kontrol DNA) kontrol DNA,
- **%5 metile kontrol için** 10 µl % 5 metile (0,5 µl % 100 metile kontrol DNA+ 9,5 µl %100 metile olmayan kontrol DNA) kontrol DNA,
- **%100 metile olmayan kontrol için** 10 µl %100 metile olmayan kontrol DNA eklenmiştir.

Toplam 90 örnek ve 6 referans LightCycler 480 real-time PCR çok kuyucuklu palete konulmuş ve cihaza yüklenmiştir.

3.3.4.Değerlendirme

Çalışmamızda meme kanseri tanısı almış 30 olgudan alınan tümörlü doku ve kan örnekleri ve 30 kontrol grubu kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra bu örneklerin bisülfid modifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler BRCA1 geninin metilasyon durumu incelenmek üzere MS-HRM cihazına yüklenmiş ve analizleri yapılmıştır. Örnekler ile aynı palete eklenen referans grupları %100 metile, %75 metile, %50 metile, %25 metile, %5 metile ve %100 metile olmayan olarak belirlenmiştir. Referans grubundan alınan pikler ile hasta ve kontrol grubu örneklerinden alınan pikler karşılaştırılarak BRCA1 geninin metilasyon düzeyi tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan MS-HRM tekniğinde analizi yapılan DNA örneklerinin erime sıcaklık değerlerine göre bir değerlendirme yapılmıştır. Analizlerde düşük erime sıcaklığı, metile olmayan sitozinleri bisülfid dönüşüm işlemi ile urasil nükleotidlerine çevrilmiş olan örnekleri ifade ederken, yüksek erime sıcaklığı metillenmiş sitozin

nükleotidlerini göstermektedir. Erime sıcaklıklarındaki göreceli artışlar da BRCA1 promotor bölgesi metilasyon oranlarındaki farklılıkları yansıtmıştır.

Hastalar yaş, histolojik derece, östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) gibi meme kanserinde önemli olan bazı prognostik faktörlere göre gruplandırıldıktan sonra örneklerin metilasyon seviyeleri ile bu prognostik faktörler karşılaştırılmıştır.

Tüm veri analizleri SPSS 15.0, Minitab 15 paket programları ile yapılmıştır. Sürekli nicel veriler; n, ortalama ve standart sapma olarak, nitel veriler ise n ve oran olarak ifade edilmiştir. Normal dağılım gösteren sürekli veriler grup sayısına bağlı olarak bağımsız yapıdaki verilere t testi ile analiz edilmiş olup normal dağılım göstermeyen verilerin grup sayılarına göre bağımsız gruplardan oluşan verilere ise, Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. Kategorik yapıdaki veri setlerine ise 2 Proportions Testi yapılmıştır. $P < 0.05$ olasılık değerleri önemli olarak kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda meme kanseri tanısı almış otuz hastanın periferik kan ve meme tümörü doku örnekleri ile aile öykülerinde meme kanseri olmayan otuz kontrolün periferik kan örnekleri kullanılmıştır. Meme kanserli olguların yaşları, histopatolojik dereceleri, ER ve PR gibi prognostik faktörleri hasta dosyalarından temin edilmiştir. Olgularda MLPA yöntemi ile taranan 35 bölge açısından mutasyon saptanmamıştır (67).

Çalışmamızda meme kanserli olguların tümör ve periferik kan dokularından, kontrol bireylerinin kanlarından elde edilen DNA'ların BRCA1 promotor bölgelerindeki metilasyon durumu MS-HRM yöntemi ile incelenmiştir. Analiz için Real-time PZR sistemine yüklenen örnekler, analiz sonrasında "Tm Calling" , Gene Scanning" ve " Difference plot" yazılımları ile karşılaştırılmışlardır. Tüm örnekler için her üç yazılımda da benzer bulgulara ulaşılmıştır. Ancak verilerin sunulmasında "Tm calling" veri tabanı temel alınmıştır. Bu analizde metilasyon dereceleri bilinen örneklerin erime sıcaklık eğrileri ve erime dereceleri ile hasta grubundan elde edilen PZR ürünlerinin erime eğrileri ve dereceleri karşılaştırılarak metilasyon durumları saptanmaktadır.

4.1. Araştırma Grubunun Prognostik Özellikleri

İncelemeye alınan otuz olgunun yaş ortalaması $52,86 \pm 12,63$ olarak tespit edilmiştir. Olguların 16/30'u (%42,81) <50 yaş iken; 14/30'u (%64,35) >50 yaş olarak saptanmıştır (Tablo 4.1). Kontrol grubu olgularının yaş ortalaması ise 56 olarak hesaplanmıştır.

Olgular tümörlerin histopatolojik derecelendirilmelerine göre derece I, derece II ve derece III olarak gruplandırılmışlardır. Tümör örneklerinin derecelerine göre dağılımlarında ise en çok derece II 16/30 (% 53,3) gözlenmiştir. Geri kalan örneklerin 5/30 (%16,7) derece I, 9/30 (%30) derece III olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Tümör tipleri değerlendirildiğinde olguların 29/30'una invaziv duktal karsinoma, 1/30'una da invaziv papiller karsinoma tanısı konmuştur. Olgular tümör tiplerine göre çeşitlilik göstermediğinden metilasyon özellikleri açısından gruplar arası istatistik değerlendirme yapılamamıştır.

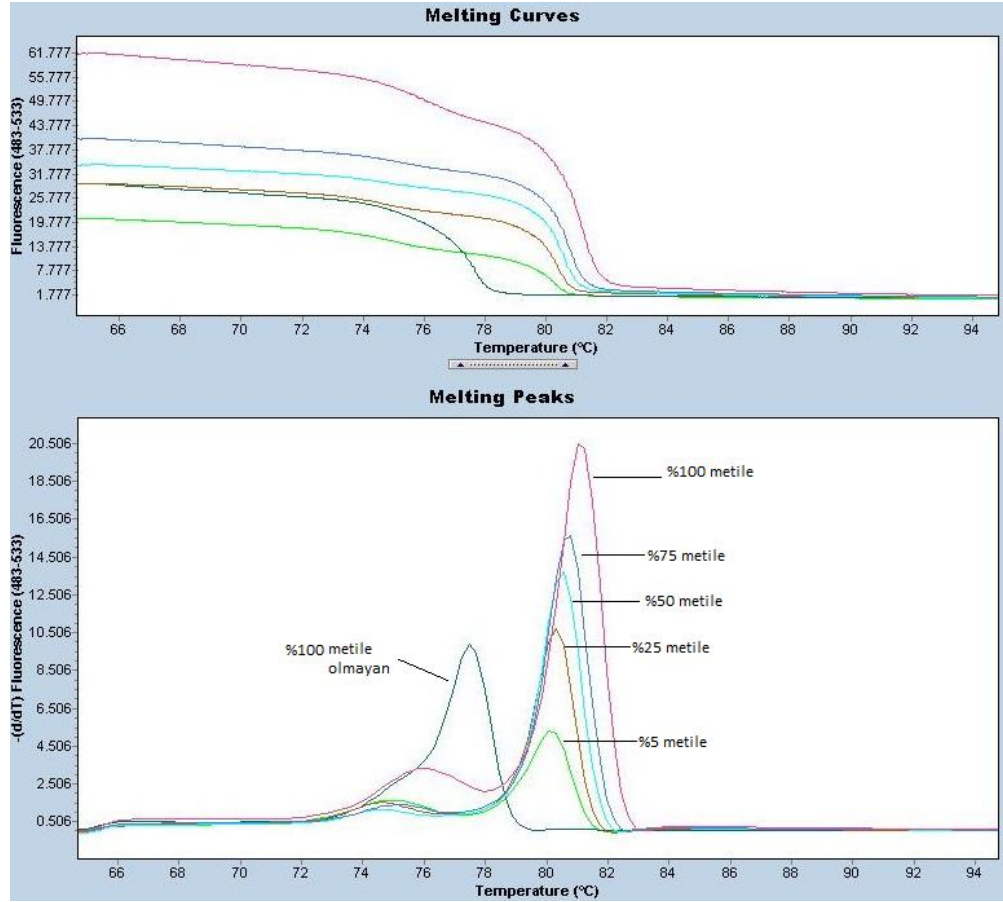
Toplam 30 olgu östrojen ve progesteron reseptörler açısından değerlendirildiğinde olguların 28/30'u (%93,4) ER+, 2/30'u (%6,7) olguda ER-, 27/30'u (%90) PR+, 3/30'u (%10) PR- olarak gruplandırılmışlardır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Olguların Demografik Özellikleri ve Olguların Sayıları

Olguların prognostik özellikleri		Olgu Sayısı
Yaş	≤ 50 Yaş	16
	>50 Yaş	14
Derece	Derece I	5
	Derece II	16
	Derece III	9
ER	Pozitif	28
	Negatif	2
PR	Pozitif	27
	Negatif	3

4.1.Tümör ve Kan Dokularında MS-HRM Bulguları

Çalışmamızda metilasyon durumlarının incelendiği 90 örnek öncelikle varsa düşük floresan sinyal veren örneklerin ayırım işlemleri gerçekleştirilmiştir. Cihazdaki negatif filtre sistemi bu örnekleri belirlemekte, gruplandırmaktadır ve erime eğrileri olmayan bu örneklerin analizlere dahil edilmesi önlenmektedir. Ancak çalışmamızda negatif örnek saptanmamıştır. Tüm örneklerde floresan sinyaller kaliteli ve birbirlerinden ayrılabilir özellik göstermişlerdir. Örneklerle ilişkin verilerin değerlendirilmesinde “Tm calling” yönteminden yararlanılmıştır. Kullanılan referans örneklerinde saptanan erime dereceleri %100 metile için $\sim 82^{\circ}\text{C}$, %100 metile olmayan için ise $\sim 77^{\circ}\text{C}$ olarak saptanmıştır. Ara metilasyon oranlarına ilişkin erime dereceleri ve spesifik pikler Şekil 4.1’de verilmiştir.

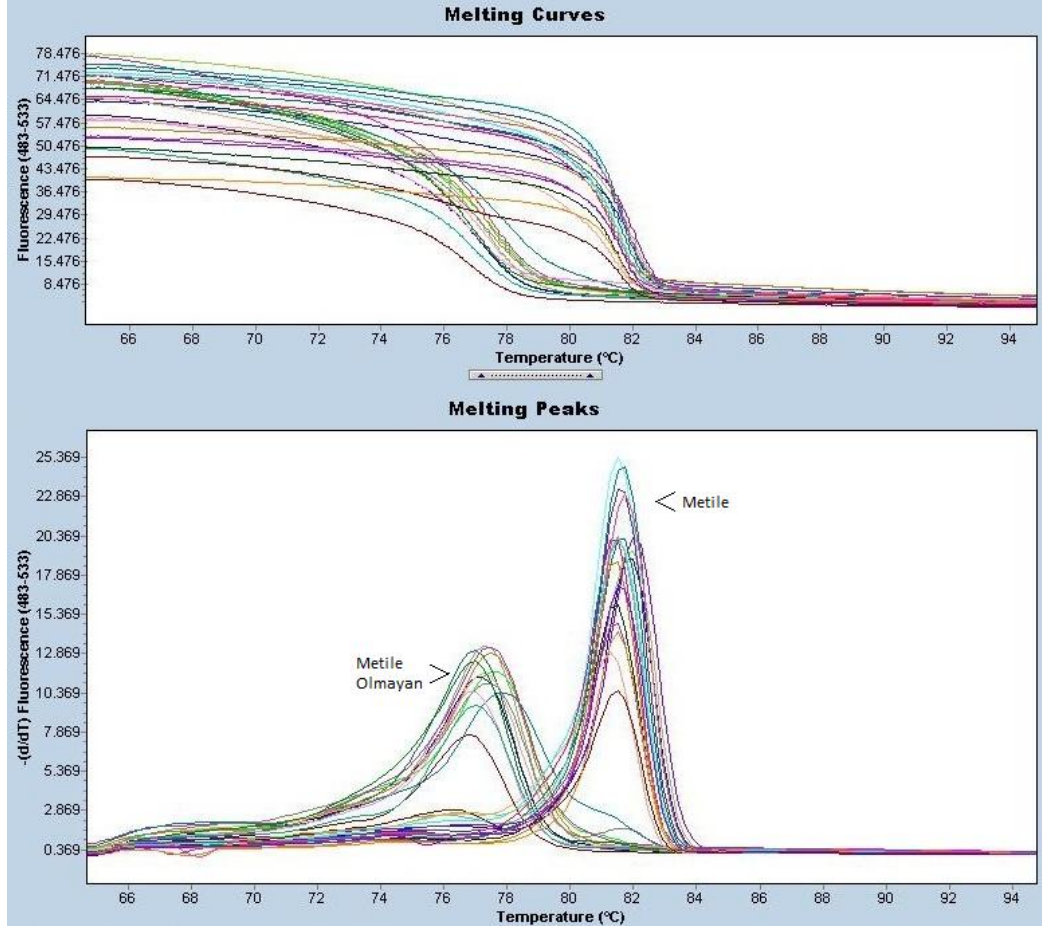


Şekil 4.1. Metile ve Metile Olmayan Referans Grubundan Alınan Pikler

“Tm Calling” yönteminde örneklerin erime profilleri metile veya metile olmayan olarak farklılık göstermektedir. Şekilde de görüldüğü üzere aşırı metillenmiş DNA’dan amplifiye olan ürünler amplikonda bulunan CpG dizileri nedeniyle daha yüksek Tm derecesine sahiptirler. Aşırı metilasyon oranının azalması ile doğru orantılı olarak erime derecelerinde de azalma gözlenmektedir. Guanin-sitozin arasındaki 3’lü, adenin-timin arasındaki ikili bağ nedeniyle; metile olmayan sitozin nükleotidleri bisülfid dönüşümü ile timin nükleotidlerine dönüştürüldüklerinden Tm dereceleri en düşük düzeydedir.

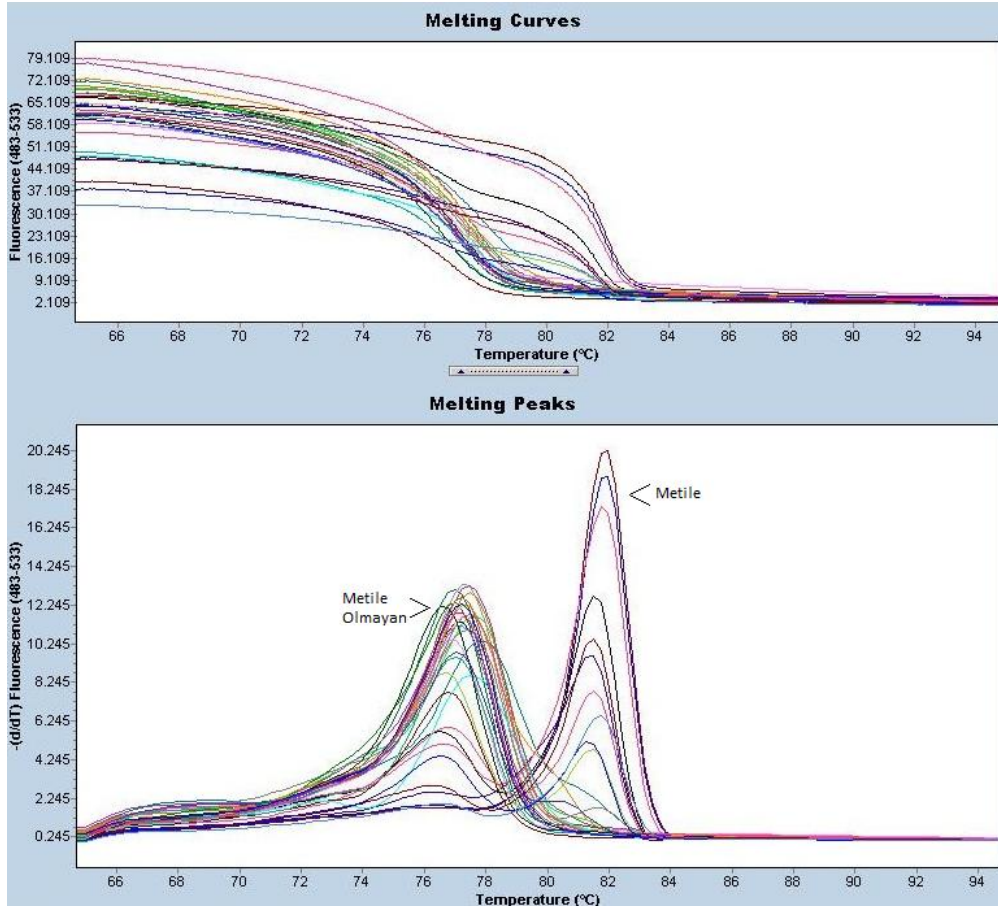
Genel olarak bakıldığında meme kanseri tanısı almış olan otuz olgunun tümör dokularından onsekizinde (%60’ında) farklı oranlarda BRCA1 geninde promotor

metilasyonu gözlenirken, olguların onkisinde (%40'ında) metilasyon gözlenmemiştir. Şekil 4.2'de tümörlere ait metile ve metile olmayan örnekler ait pikler gözlenmektedir.



Şekil 4.2.Olgularımızın Tümör Dokularından Alınan Metile ve Metile Olmayan Pikler

Olguların periferik kan DNA'larında yapılan analizde ise 5/30 (%16,7) olguda metilasyon saptanmıştır. Şekil 4.3'de metile ve metile olmayan olgulara ve kontrol DNA'larına ait pikler görüntülenmiştir. Kontrol olarak analiz edilen otuz periferik kan DNA örneğinde ise metilasyon saptanmamıştır.

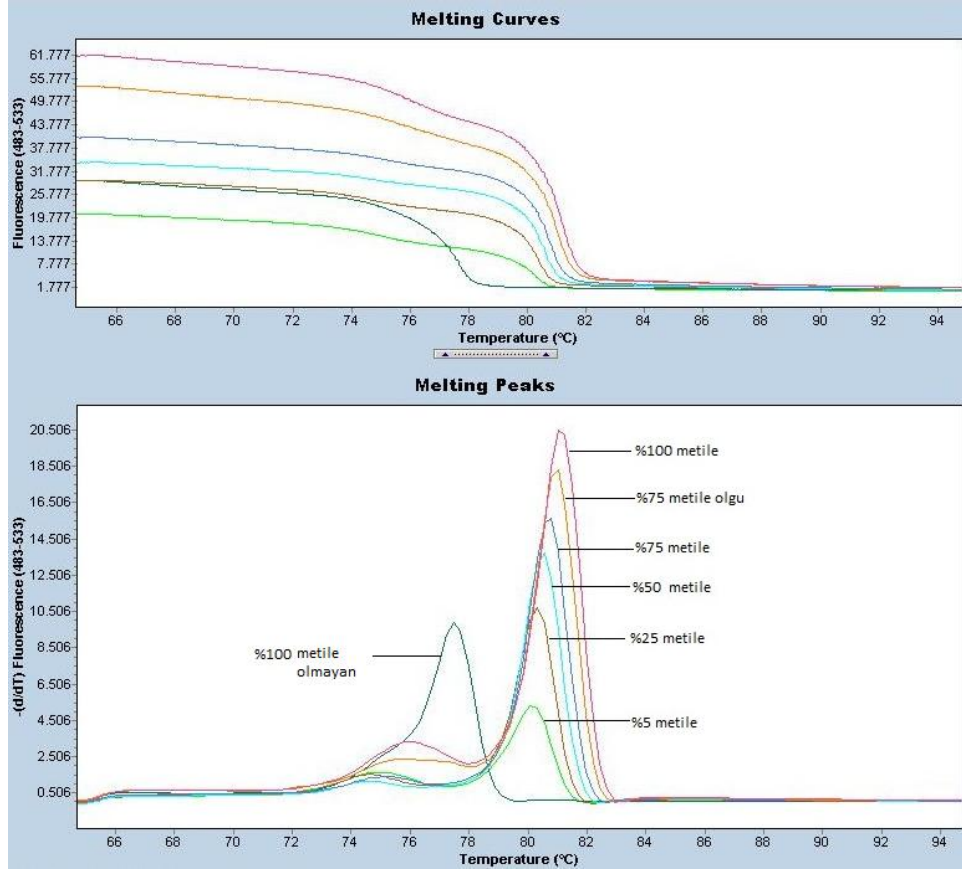


Şekil 4.3 Olgularımızın Kanlarından Alınan Metile ve Metile Olmayan Pikler

Tümör dokularında BRCA1 geninin promotor bölge metilasyonu 2/30 olguda %75 metile (Şekil 4.4), 3/30 olguda %50 metile, 9/30 olguda %25 metile, 4/30 olguda %5 metile, 12/30 olguda ise metile değil (Şekil 4.5) olarak saptanmıştır. Tablo 4.2.'de olgularımızın BRCA1 geni promotor metilasyonu yüzdeleri gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Olgularımızın Tümörlerinin BRCA1 Geni Promotor Metilasyonu Oranları

TümörMetilasyon	%75	%50	%25	%5	Metile Olmayan
Olgu Sayısı	2	3	9	4	12

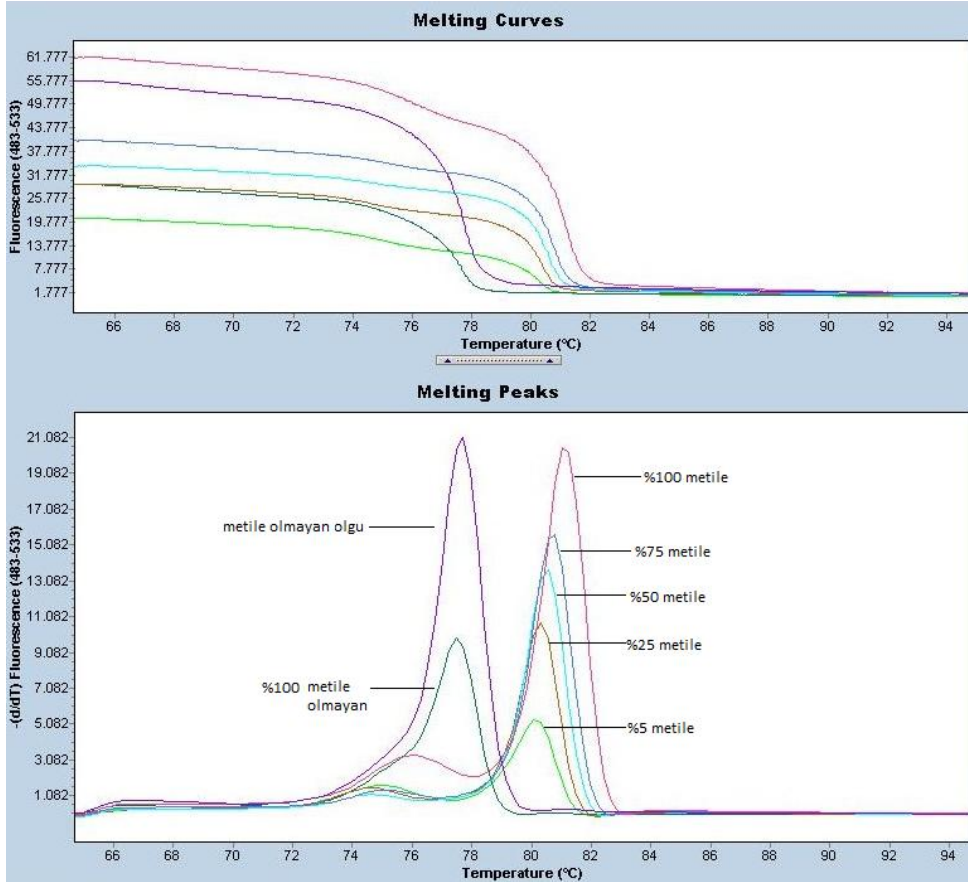


Şekil 4.4 %75 Metile Gözlenen Olgulardan Örnek

Meme kanseri olgularının kan dokularında periferik kan örneklerinde yapılan analizlerde elde edilen metilasyon pikleri, metilasyon oranlarına özgü referans pikleri ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucu olgulardan sadece birinde %5 ve dört olguda da <%5 oranında BRCA1 aşırı metilasyonu olduğu, geri kalan 25 örneğin piklerinin %100 metile olmayan referans DNA pikleri ile örtüştüğü saptanmıştır. Periferik kanlarında metilasyon saptanan 5 olgunun tümör dokularının da farklı oranlarda metile olduğu gözlenmiştir. Olguların periferik kan DNA'larına ait metilasyon durumu verileri Tablo 4.3'de gösterilmiştir

Tablo4.3 Meme Kanseri Olgularının Kan Dokularının BRCA1 Geni Promotor Metilasyonu Oranları

Kan Metilasyon	%5	<%5	Metile Olmayan
Olgu Sayısı	1	4	25



Şekil 4.5 Metile Olmayan (Unmetile) Olgulardan Örnek

4.1.1. Yaş ile BRCA1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Meme kanseri olgularının tümör örneklerinde değişik oranlarda BRCA1 geni promotor metilasyonu gözlenen toplam 18 olgunun yaş ortalaması $57,83 \pm 12,29$ iken,

metile olmayan toplam 12 olgunun yaş ortalaması $45,41 \pm 12,63$ olarak saptanmıştır. Meme kanseri tanısı alan olguların periferik kan örneklerinde BRCA1 geni promotor metilasyonu saptanan toplam beş olgunun yaş ortalaması ise $48 \pm 12,20$ iken, metile olmayanların yaş ortalamaları $53,84 \pm 12,73$ olarak hesaplanmıştır.

Yaşı <50 olan 7/16 olgunun tümör DNA'larında BRCA1 geninde promotor metilasyonu gözlenirken, kan DNA'larının 3/16 olguda promotor metilasyonu gözlemlenmiştir. Yaşı >50 olan 11/14 olgunun tümör DNA'larının BRCA1 geninde promotor metilasyonu gözlenirken, 3/14 olgunun kan DNA'larında promotor metilasyonu gözlenmiştir. Olguların yaş ve metilasyon durumları Tablo 4.4'de özetlenmiştir.

Tablo 4.4 Olguların Yaşları ve Metilasyon Durumları

YAŞ	Hasta Sayısı	Metile Tümör	Metile Kan	Metile Olmayan Tümör	Metile Olmayan Kan	Metile Kan %	Metile Tümör %
<50	16	7	3	9	13	%18,75	%43,75
>50	14	11	2	3	12	%14,29	%78,58

Yaş ve metilasyon durumlarının karşılaştırılmalarında gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p>0,05$).

4.1.2. Tümörün Evresi ile BRCA1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

BRCA1 geninde promotor metilasyonu gözlenen 3/5 olgu derece I, 12/16 olgu derece II ve 3/9 olgu derece III olarak saptanmıştır. Metile ve metile olmayan olguların, tümörlerin derecesi ile dağılımı Tablo 4.5'de gösterilmiştir. BRCA1 geninde promotor metilasyonu gözlenen olguların %66,7'si derece II olarak saptanmıştır. Derece III'de

daha yüksek metilasyon oranı beklenmiştir. Fakat derece III olan olguların sayısının azlığı nedeni ile karşılaştırma yapılamamıştır. Bununla beraber tümör derecenin artması ile periferik kanda daha yüksek sıklıkla BRCA1 geni metilasyonu gözleendiği tabloda kendini göstermektedir. Yapılan istatistiksel analiz sonucu tümörün derecesi ile tümör dokularında BRCA1 geni promotor metilasyonu ilişkisi anlamsız ($p>0,05$), kan dokularındaki metilasyon ile tümörün derecesi arasındaki ilişki anlamlı kabul edilmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.5. Metile ve Metile Olmayan Olguların Tümörlerin Derecesine Göre Dağılımı

Derece	Hasta Sayısı	Metile Tümör	Metile Kan	Metile Olmayan Tümör	Metile Olmayan Kan	Metile Kan %	Metile Tümör %
I	5	3	-	2	5	-	%60
II	16	12	1	4	15	%6,25	%75
III	9	3	4	6	5	%44,5	%33,4

Tümör dereceleri ile metilasyon oranlarının yüzdeleri karşılaştırıldığında metilasyon gözlenen derece I olan tümörlerden 2 örnekte %25, 1 örnekte %5 oranında metilasyon oranı saptanmıştır. Derece II olan metile olgulardan 7 tanesi %25 metile, 3 tanesi %5 metile, 1 tanesi %50 metile ve 1 tanesi %75 oranında metile olduğu gözlenmiştir. Derece III olan metile olgulardan ise 2 tanesi %50 bir tanesi %75 metile olarak saptanmıştır. Tümörün derecesi arttıkça metilasyon oranının da arttığı gözlenmiştir.

4.1.4. ER ile BRCA1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Hastaların 28/30'unda ER durumu pozitif gözlenirken bunların 17 tanesinin tümörleri metile, 5 tanesinin de kanları metile olarak saptanmıştır. Hastalardan ER durumu negatif olan iki hastadan birinin tümör ve kan DNA'sında BRCA1 promotoru metile olmadığı, diğerinin tümör DNA'sı metile, kan DNA'sı metile olmadığı gözlenmiştir. Metile olan olguların %94,5'i ER+ olarak saptanmıştır. Olguların ER ve metilasyon durumlarına göre dağılımları Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6 Metile ve Metile Olmayan Olguların ER Durumlarına Göre Dağılımı

ER Durumu	Hasta Sayısı	Metile Tümör	Metile Kan	Metile Olmayan Tümör	Metile Olmayan Kan	Metile Kan %	Metile Tümör%
Pozitif	28	17	5	11	23	%17,86	%60,72
Negatif	2	1	-	1	2	-	%50

4.1.5. PR ile BRCA1 Geni Promotor Metilasyonu İlişkisi

Hastaların 27/30'unda PR durumu pozitif gözlenirken bunların 15'inin tümörleri metile (%55.6), 4 tanesinin de kanları metile olarak saptanmıştır. Progesteron reseptör durumu negatif olan 3 hastanın ise tümünün tümör DNA'sı metile, 1 tanesinin kan DNA'sı metile, diğer ikisinin kan DNA'sı BRCA1 promotoru metile olmadığı gözlenmiştir. Olguların PR ve metilasyon durumlarına göre dağılımları Tablo 4.7'de özetlenmiştir.

Tablo 4.7. Metile ve Metile Olmayan Olguların PR Durumlarına Göre Dağılımı

PR Durumu	Hasta Sayısı	Metile Tümör	Metile Kan	Metile Olmayan Tümör	Metile Olmayan Kan	Metile Kan %	Metile Tümör%
Pozitif	27	15	4	12	23	%15,82	%55,6
Negatif	3	3	1	-	2	-	%100

5.TARTIŞMA

Meme ve over kanseri hastalarında şimdiye kadar 300'den fazla BRCA1 mutasyonu tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar BRCA1 geninin bütün kodlayan bölgelerinde saptanmış ve anormal protein oluşumu veya BRCA1 transkriptinin kaybı ile sonuçlandığı gözlenmiştir. BRCA1 gen mutasyonlarının ailesel meme kanserlerinin tümör oluşumunda önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Somatik mutasyonlar sporadik meme kanserlerinin küçük bir bölümünde saptanmıştır. Bu çalışmalardan çıkan sonuçlara göre sporadik meme kanserlerindeki düşük BRCA1 ekspresyonu sebebi somatik mutasyonların dışında başka mekanizmaların sonucu olabileceğini düşündürmektedir (46).

Son çalışmalarda gen ekspresyonunun promotor bölgesindeki CpG metilasyonu ile düzenlendiği birçok tümör baskılayıcı gende gösterilmiştir (46). Meme kanserli olgularda BRCA1 promotor metilasyonu ilk olarak 1997 yılında Dobrovic ve Simpfendorfer tarafından sporadik meme kanserlerinde gösterilmiştir (15). Mancini ve ark BRCA1'in CpG metilasyonunun tümör spesifik olduğunu ve CREB (cAMP-responsive element binding) bölgesinde gerçekleştiğini saptamıştır (39). Bu bulgular, sporadik meme kanserlerindeki düşük BRCA1 ekspresyonunun, BRCA1 geninin 52 regülatör bölgesindeki CpG metilasyonu ile "down-regüle" olduğunu (susturulduğunu) öne sürmüştür. Ancak BRCA1'in aşırı metilasyon ile inaktivasyonunun ortaya çıkışı hala tartışma konusudur (46).

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında meme kanseri tanısı almış otuz olgu kullanılmıştır. Bu olgular ile yapılan çalışmada MLPA yöntemi ile BRCA1 geninin 35 bölgesinde mutasyon saptanmayan örnekler çalışmamıza dahil edilmiştir (67). Olgulara ait tümör ve kan dokularından elde edilen DNA örneklerinde BRCA1 promotor metilasyonu MS-HRM yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmamızda meme kanseri hastalarının tümörlü ve periferik kan

dokularındaki epigenetik değişimler ile yaşı ve ER, PR durumu, tümör dereceleri arasındaki ilişki araştırılmıştır.

5.1. MS-HRM Yöntemi İle BRCA1 Promotor Metilasyonu İçin Elde Edilen Verilerin Literatür İle Karşılaştırması

5.1.2. Periferik Kan Metilasyon Durumlarının Literatür İle Karşılaştırılması

Yapılan çalışmalarda metilasyon durumu kanser ve diğer başka hastalıklarda, hastalıklı olmayan doku seviyesinde saptanmıştır. Bu da kan dokusu DNA'sı metilasyonunun potansiyel bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceği fikrini doğurmuştur (65). Biz de bu fenomenden yola çıkarak alışmamızda BRCA1 metilasyon seviyesinin periferik kanda gözlenip gözlenmediğini araştırdık.

Wong ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada kadınlarda meme kanserinin gelişim sürecinde BRCA1 promotor bölgesindeki yapısal metilasyonunun etkisini, hastaların periferik kan ve tümör dokularında incelemişlerdir. Bu çalışmada periferik kanda BRCA1 metilasyonunun erken başlangıçlı meme kanserlerinin tanısı için kullanılabilirliği araştırılmıştır. BRCA1 germ hücre soyu mutasyonu taşımayan 255 hastalık olgu grubu, bunların uygun olanlarından elde edilen 52 tümör dokusu ve etkilenmemiş 169 olgunun kan örnekleri ile yaptıkları çalışmada BRCA1 geninin metilasyon durumunu MethyLight ve MS-HRM yöntemleri ile belirlemişlerdir. Periferik kanda 28/255 olguda metilasyon saptadıkları bu çalışmada, metile olarak gözlenen olguların metilasyon yüzdeleri %1-5 arasında, düşük seviyelerde olarak belirtilmiştir. Kontrol grubu olgularının 4 tanesinde düşük seviyede (yaklaşık %1) metilasyon gözlenmiştir (75).

Iwamoto ve arkadaşları 2010 yılında periferik kan hücrelerinin BRCA1 metilasyonunun meme kanseri gelişiminde risk faktörü olup olmadığını araştırmışlardır. Periferik kan hücrelerindeki BRCA1 promotor metilasyonu ile meme kanseri arasındaki

ilişki 200 meme kanseri hastası ve 200 kontrol bireyde çalışılmıştır. Hasta grubunun periferik kan ve tümör DNA'ları metilasyon spesifik kantitatif PZR ile incelendiğinde, 43 hastanın (%21.5) ve 27 kontrolün (%13.5) periferik kanında BRCA1 promotor metilasyonu gözlenmiştir (32).

Wojdacz ve arkadaşlarının 2011 yılında kanserle ilişkili **BRCA1**, APC ve RASSF1A genlerinin 75 meme kanseri olgusu üzerinde hem periferik kan DNA'sı hem de tümör dokusu DNA'sındaki metilasyon durumlarının karşılaştırılması amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Sadece periferik kan DNA'larında BRCA1 promotoru metile olan 3 örnek (%4) MS-HRM yöntemi ile saptanmıştır (73).

Snell ve arkadaşları 2008 yılında BRCA1 mutasyonu olan meme kanserli vakalara benzer patolojik özellikler gösteren 7 olgu ile yaptıkları çalışmada, BRCA1 metilasyonu seviyelerini MS-HRM ve MethyLight yöntemleri ile araştırmışlardır. Bu yedi olgunun hepsinin aile öykülerinde BRCA1 tümör tipine benzer meme kanseri vardır ve olguların BRCA1 ve BRCA2 genlerinde yapılan mutasyon taramalarında, hiçbir mutasyon saptanmamıştır. Olgulardan üçünün periferik kanları ve tümörlerinde BRCA1 metilasyonu gözlenmiştir. Periferik kan DNA'larındaki düşük metilasyon seviyeleri (%1-10) kullanılan hassas yöntemlerle saptanabilmiştir (59).

Catteau ve arkadaşlarının sporadik kanserlerde tümör baskılayıcı genlerin düşük ekspresyon profil göstermesi fenomeninden yola çıkarak yaptıkları çalışmada 96 sporadik invaziv meme kanseri ve 43 over kanseri olan olgularının tümörlerindeki metilasyon paterni Southern blot analizi ile ölçülmüştür. Sporadik meme kanserli olgulardan 15 tanesinin periferik kanlarında metilasyon saptanmamıştır (10). Bu durumun seçilen olguların Wong (75) ve Snell'in (59) çalışmasındaki gibi BRCA1 benzeri tümör patolojisi göstermemeleri ve olguların diğer klinikopatolojik özelliklerinin uyumsuz olmasından kaynaklandığı düşünmekteyiz.

Bizim çalışmamızda otuz olguluk çalışma grubunun periferik kan dokularında %16,7 oranında metilasyon saptanmıştır. Kan dokularındaki metile gözlenen olgu oranı Iwamoto ve arkadaşlarının bulgularıyla benzerlik gösterirken Wojdacz ve ark. çalışmasından oransal olarak fark gösterir. Ancak periferik kan DNA'ları metile olan olgularımızın tümörlerinin de metile olarak gözlenmesi açısından benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Wong ve ark. çalışmasından farklı olarak etkilenmemiş kontrol grubumuzda metilasyon gözlenmemiştir (75). Çalışmamızda 4 hastanın periferik kan DNA'larında %1-5 arasında, bir hastada %5 oranında metilasyon gözlenmiştir. Snell ve ark. periferik kan DNA'larında saptadığı düşük metilasyon seviyesi bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi araştırma grubu olgularının periferik kan örneklerinde saptanan aberan metilasyonun sirkülasyonundaki serbest tümör hücrelerinden kaynaklanmadığı, bu metilasyon paterninin somatik doku ile ilişkili olduğu düşüncesindeyiz.

5.1.3 Tümör Metilasyon Durumlarının Literatür İle Karşılaştırılması

Wong ve arkadaşlarının MethyLight ve MS-HRM yöntemlerini kullanarak yaptıkları çalışmada meme tümörlerindeki BRCA1 metilasyonu olan hastaların oranı %23.07 (12/52)'dir. Meme kanseri olgularını, BRCA1 mutasyonu olan meme tümörlerine benzerlikleri açısından 9 morfolojik özelliğe göre gruplandırmışlardır. Beş ya da daha fazla özellik taşıyanlar 1. Grup olgularda, dört morfolojik özellik taşıyanlar 2. Grup, üç ya da daha az morfolojik özellik taşıyan 3. Grup olarak tanımlanmıştır. İncelenen tümör dokularından, 1. Gruptaki 20 tümörden 9'unda (%45) BRCA1 metilasyonu saptanmıştır. Bu gruplama sistemine benzetilerek tümör derecesi 2 ve 3 olan toplamda 25 olgumuzun 15'inde (%60) metilasyon değişik oranlarda saptanmıştır. Diğer çalışmalara oranla Wong ve arkadaşlarının sonuçlarına daha yakın bulgular elde etmemiz metilasyon analizi yöntemlerimizin benzer ve aynı hassasiyette olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz (75).

Niwa ve ark. 2000 yılında sporadik meme kanserinde BRCA1'in biyolojik rolünü araştırmak için BRCA1 promotor bölgesinin DNA metilasyonu ile BRCA1 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi moleküler biyolojik ve immünohistokimyasal yöntemler kullanarak incelemişlerdir. İncelenen BRCA1 promotor bölge metilasyonu restriksiyon enzimleri ile kesime bırakılıp jel görüntüsü elde edilerek saptanmıştır. Hastaların hepsi histolojik sınıflandırma sonucu invaziv duktal karsinoma olarak belirtilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 32 sporadik meme kanseri olgusunun 10'unda (%31) BRCA1 promoter bölgesinde metilasyon saptanmıştır (46).

Matros ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları sporadik meme kanseri olgularında BRCA1 promotor metilasyonunun araştırıldığı çalışmada 75 invaziv meme tümöründe MSP yöntemini kullanmışlardır. Olgulardan 12'sinde tümör metilasyonu saptanmıştır (%16) (40).

Iwamoto ve arkadaşlarının 200 meme kanseri hastası ve 200 kontrol olgusunda periferik kan ve tümör DNA'larını metilasyon spesifik kantitatif PZR ile incelendiğinde, DNA örnekleri uygun olan 162 tümör dokusunun ise 31'inde (%19.1) BRCA1 promotor metilasyonu saptanmıştır. Çalışılan tümörlerin histolojik tipleri farklılıklar göstermektedir (lobüler, duktal ve diğer) (32).

Birgisdottir ve arkadaşlarının 2006 yılında 143 meme kanseri olgusu üzerinde yaptıkları BRCA1 promotor metilasyonu çalışmasında tümörlerin 13'ünde (%9,1) metilasyon saptamışlardır. Tümörlerin metilasyon durumları metilasyon spesifik PZR ile araştırılmıştır (6).

Catteau ve arkadaşlarının çalışmasında meme ve over kanserli olguların metilasyon durumu ile hastalığın klinikopatolojik parametreleri arasındaki ilişkinin Southern blot analizi ile saptanması amaçlanmıştır. BRCA1 promotor metilasyon profili incelendiğinde meme kanserli tümörlerin 11/96'sında (%11) ve over kanserli tümörlerin %5'inde metilasyon saptanmıştır (10).

Bianco ve arkadaşlarının 2000 yılında 18 meme kanseri hastasında Southern blot yöntemi ile yaptıkları çalışmada 18 vakanın 4'ünde (%22,3) BRCA1 promotor bölgesi CpG adacıkları metile olarak saptanmıştır (5).

Bizim çalışmamızda olgularımızın tümörlerinin %60'ında değişik oranlarda metilasyon saptanmıştır. Niwa, Matros, Iwamoto, Birgisdottir, Catteau ve Bianco'nun bulguları ile bizim çalışmamızın bulgularının oransal farklılığının sebebi olarak metilasyon saptanmasında kullanılan metodların farklılığı gösterilebilir. Metilasyon spesifik PZR, Southern blot gibi düşük metilasyon seviyelerinin saptanamadığı yöntemler kullanılmıştır. Kullanılan MS-HRM yöntemi, metile olmayan DNA örneği içerisindeki % 0,1 oranındaki metile DNA'yı tespit edebilmesi açısından diğer kantitatif olmayan restriksiyon enzimleriyle kesim ve jel görüntüleme yöntemine göre daha hassastır. Bu sebeple araştırmacıların kullandığı bu yöntemde düşük metilasyon seviyeleri gözlenemeyeceğini, oransal farkın bu nedenle ortaya çıktığını düşünmekteyiz. Ayrıca olguların tümörlerinin histolojik tiplerinde farklılık göstermesi, tümör heterojenitesi, ilgilenilen promotor bölgesinde CpG adası yoğunluğu, hedeflenen bölge ve primer setleri çalışmadan çalışmaya fark gösterebileceğini düşünmekteyiz.

Xu ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada BRCA1'in promotor metilasyonu invaziv ve in-situ meme kanserli kadının 851 tümör dokusundan çalışılmış. MSP yöntemi ile yapılan metilasyon analizinde tümörlerin yaklaşık %59'unun BRCA1 promotor bölgesi metile bulunmuştur (79).

Bizim çalışmamızda tümör dokularında saptadığımız %60'lık metile olgu oranına benzemekle birlikte, bu araştırma aynı zamanda metile olguların çoğunun invaziv olmasıyla da çalışmamızla uyum göstermektedir.

5.1.4. Metilasyon Durumları ve ER/PR Durumlarının Literatür İle Karşılaştırılması

Niwa ve ark. 32 sporadik meme kanseri olgusunun 10'unda (%31) BRCA1 promotör bölgesinde metilasyon saptanmıştır. İmmünohistokimyasal yöntemlerle ER+ olarak saptanan 4/19 olgu (%21) metile olarak gözlenmiştir (46).

Matros ve arkadaşlarının 75 invaziv meme tümörünün 12'sinde tümör metilasyonu saptanmıştır (%16). Karşılaştırılan ER ve PR durumları ile BRCA1 metilasyonu arasında istatistiki olarak anlamlılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Olgular bu özelliklerine göre alt gruplara ayrıldığında “düşük derece- ER pozitif” olan tümörlerin 6/36'sında (%16,7) metilasyon gözlenmiştir. “Yüksek derece- ER pozitif” olan tümörlerde ise 6/12 (%50) oranında metilasyon saptanmıştır. Bu çalışmaya göre yüksek derecelerde ve ER pozitif olan tümörlerde metilasyon sıklığı daha fazladır (40).

Çalışmamızda yaş, ER ve PR durumları ile tümör dokularının metilasyon durumları istatistiksel olarak karşılaştırılarak analiz edildiğinde p değerine göre anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$). Bu bulgular Matros ve arkadaşlarının istatistik bulguları ile uyumludur. Bizim çalışmamızda ER+ olan 28 hastanın 17'sinin (%60,7) tümör dokularında metilasyon saptanmıştır. Matros ve arkadaşlarının bulgularıyla benzer olarak ER+ olan olgularda daha yüksek metilasyonlu olgu sayısı saptanmıştır. Oransal olarak bakıldığında ise (Matros ve ark. çalışmasında ER+ hastaların %50'si metiledir) benzer oranlar gözlenmiştir.

Catteau ve arkadaşlarının 96 sporadik invaziv meme kanseri ve 43 over kanseri olgularının tümörlerindeki BRCA1 promotör metilasyonu ER ve PR ekspresyonu eksikliği (ER ve PR negatifliği) ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Metile olan bütün meme tümörleri ER ve PR negatiftir (10).

Xu ve arkadaşlarının analizinde 851 tümör dokusundan metile ve metile olmayan olarak saptanan hastaların yaklaşık olarak yarısı pozitif ve negatif olarak ayrıldığından, bu populasyon için ER ve PR durumları ve metilasyon durumları ile ilişki kurulamamıştır (79).

Birgisdottir ve arkadaşlarının 143 meme kanseri olgusu üzerinde yaptıkları BRCA1 promotor metilasyonu çalışmasında tümörlerin 13'ünde (%9,1) metilasyon saptamışlardır. Metile tümörlerin 7/13 ER-, 6/13 ER+ ($p=0,0475$). Progesteron reseptör (PR) durumlarına bakıldığında ise 6/13 PR-, 6/13 PR+ olarak gözlenmiştir (6).

Iwamoto ve ark. 162 tümör dokusunun ise 31'inde (19,1%) BRCA1 promotor metilasyonu saptanmıştır. Çalışmada BRCA1 geni metile olan tümörler genelde ER ve PR negatif olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada tümör dokuları için bu değerler ER için $P=0,068$ ve PR için $P=0,006$ olan değerleri bizim çalışmamızla karşıt olarak BRCA1 promotor metilasyonun daha çok ER ve PR negatif olgularda gözlenmiştir (32).

Çalışmamızdaki bulgularımıza göre tümör dokuları için ER ve PR durumlarının istatistiki değerlendirilmesinde, ER için $p = 0,648$, PR için $p=0,653$ değerleri, $p>0.05$ kriterine göre anlamsız bulunmuştur. Ancak bu bulgular değerlendirildiğinde olgulardan ER+ olanlarda metilasyon daha yüksek sıklıkta gözlenmiştir. Buna karşılık PR+ olan olguların %55 kadarında metilasyon aberasyonları gözlenirken PR- olan üç olguda da aşırı metilasyon saptanmıştır. Çalışmamızda PR- olgu sayısının azlığı nedeniyle tümör aberan metilasyonunun PR- olgularda daha yüksek sıklıkta gözlendiğine ilişkin tartışmaya yorum yapılamamıştır.

5.1.5. Metilasyon Durumları ve Tümör Derecelerinin İlişkisinin Literatür İle

Karşılaştırılması

Wong ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada meme tümörlerindeki BRCA1 metilasyonu olan hastaların oranı %23.07 (12/52)'dir. İncelenen tümör dokularından, 1. Gruptaki (dereceleri daha yüksek olan olgu grubu) 20 tümörden 9'unda BRCA1 metilasyonu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda tümör derecesi 2 ve 3 olan toplamda 25 olgumuzun 15'inde (%60) metilasyon değişik oranlarda saptanmıştır. Oranlar karşılaştırıldığında ortaya çıkan farkın olgu sayımızın azlığından kaynaklandığını düşünülmektedir (75).

Wong ve ark. çalışmasında yapılan gruplandırma sistemine göre periferik kan metilasyon paternleri; 9 morfolojik özellikten 5 ya da daha fazlasını taşıyan 1. Grup olgularda (52 olgu) %31 oranında, 4 morfolojik özellik taşıyan 2. Grup olgularında (39 olgu) %10, 3 ya da daha az morfolojik özellik taşıyan 3. Grup olgularında (164 olgu) %5 oranında gözlenmiştir. 1. Grup tümör dokularında ise 9/20, 3. Grup olgularında 3/32 oranında metilasyon saptanmıştır (75).

Bizim çalışmamızda Wong ve ark. çalışmasına benzer olarak periferik kan metilasyon dereceleri bir olguda %5'ten yüksek, diğer 4 olguda %5 ve daha az şeklinde düşük seviyelerde gözlenmiştir. Çalışmamızda metilasyon tümör derecesi I olan periferik kan DNA'larında metilasyon gözlenmezken, derecesi II olanların birinde, derecesi III olanların ise dördünde metilasyon saptanmıştır. Wong ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile karşılaştırıldığında periferik kanda saptanan metilasyon oranlarının düşük olması ve 1. Grup'tan 3. Gruba doğru azalan bir metilasyon oranı, bizim çalışmamızla benzerdir. Periferik kanda düşük seviyelerde gözlenen metilasyonun sebebi metile meme tümör hücrelerinin kandaki sirkülasyonundan kaynaklandığı tartışılabilir. Ancak sirkülasyondaki tümör hücreleri düşük seviyelerdedir ve hücre kültürü yapılmaksızın izole edilmeleri olasılık dışı olduğu düşünülmektedir.

Niwa ve ark. sporadik meme kanserlerinde BRCA1 promotor bölgesinin DNA metilasyonunu 32 sporadik meme kanseri olgusunun 10'unda (%31) saptamışlardır. BRCA1 promotoru metile olarak saptanan 10 hastanın ikisi derece II, sekizi derece III'tür (46).

Birgisdottir ve arkadaşlarının 143 meme kanseri olgusu üzerinde yaptıkları BRCA1 promotor metilasyonu çalışmasında tümörlerin 13'ünde (%9,1) metilasyon saptamışlardır. Tümör derecelerine göre gruplandırma yapıldığında metile olan olguların 7/13 derece III, 5/13 derece II, 1/13 derece I olarak belirtilmiştir (6).

Çalışmamızda tümör derecesi II olan 16 olgunun 12'sinde (%75), tümör derecesi III olan dokuz hastanın üçünde (%33,4) değişik oranlarda metilasyon saptanmıştır. Birgisdottir ve ark. çalışmasına göre, tümör derecesi ile metilasyon durumları karşılaştırıldığında, derecesi yüksek olan olgulardan metile olanlarının daha fazla olması beklenmektedir. Ancak bizim bulgularımıza göre tümör derecesi II olan olgular daha fazladır. Bu sebeple tümörün derecesi ile metilasyon arasında bir ilişki kurulamamıştır.

Iwamoto ve arkadaşları 162 tümör dokusunun ise 31'inde (19,1%) BRCA1 promotor metilasyonu saptanmıştır. Olguların tümör derecelerine göre gruplandırma yapıldığında derece I olan 53 olgunun sekizinde (%15,1), derece II olan 80 olgunun 14'ünde (%17,5), derece III olan 21 olgunun yedisinde (%33,3) BRCA1 promotor metilasyonu gözlenmiştir (32).

Bizim çalışmamızda olgular tümör derecelerine göre gruplandırıldığında metile olan olgular 3/5 (%60), derece II olan olgular 12/16 (%75), derece III olan olgular 3/9 (%33,4) olarak gözlenmiştir. Iwamoto ve arkadaşlarının çalışmalarına benzer olarak derece II olan hasta sayısı bizim çalışmamızda da derece III olanlardan daha fazladır. Ancak araştırmacıların bulgularında bu dereceye göre metilasyon artış oranı beklentilere uygun olduğu gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda derece III olan tümörlerdeki

metilasyon oranı daha fazla beklenirken, derece II olanlardaki metilasyon oranının daha fazla gözlenmesinin sebebi olarak toplam hasta sayımızın azlığı, bu nedenle karşılaştırma sonucu benzer oranlara rastlanmadığını söyleyebiliriz. Tümör derecesi ve tümörlerin metilasyon durumları istatistiki olarak değerlendirildiğinde ise iki çalışmada da anlamlı bir ilişki olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$).

Metilasyon durumu tümör derecesi ile karşılaştırıldığında, bulgular sporadik meme kanserlerinde BRCA1 metilasyonunun kendi ekspresyonuna etki edebileceği ve ekspresyonun da hücre döngüsü regülasyonunda önemli rolü olduğu ve malignansi derecelerini etkileyebileceğini düşünmekteyiz. Tümörün derecesi ile metilasyonun doğru orantılı olduğu literatürdeki çalışmalarda gösterilmiştir. Olgu sayısının orantısız olması (derece II olan olgu sayısının derece III olanlardan fazla olması) bu ilgiyi kuramamızın sebebi olabileceğini düşünmekteyiz.

BRCA1 protein ekspresyon analizleri ile promotor metilasyonunu karşılaştırıldığında aralarında ters orantı BRCA1 promotor metilasyonunun düşük BRCA1 ekspresyonuna neden olabileceği daha önce birçok çalışmada gösterilmiştir (9, 32, 40, 46, 55, 63). Bu bilgiler doğrultusunda sporadik meme kanserlerinde BRCA1 promotor metilasyonunun kanser gelişim aşamalarından biri olabileceği tartışılmıştır. Bizim çalışmamızda BRCA1 ekspresyon analizi yapılmadığı metilasyon durumu ile karşılaştırma yapılmamıştır.

Tablo 5.1. Metilasyon Bulgularının Literatür İle Karşılaştırılması

Araştırmacı	Periferik Kan (n)	Periferik Kan Metilasyon (%)	Tümör (n)	Tümör Metilasyon (%)	Yöntem
Catteau ve ark. 1999	15	%0	96	%11	Southern blot
Niwa ve ark. 2000	-	-	32	%31	Restriksiyon kesim
Bianco ve ark. 2000	-	-	18	%22	Southern blot
Matros ve ark. 2005	-	-	75	%16	Metilasyon Spesifik PZR
Birgisdottir ve ark. 2006	-	-	143	%9,1	Metilasyon Spesifik PZR
Snell ve ark. 2008	7	%42,85	7	%42,85	Methylight ve MS-HRM
Xu ve ark. 2010	-	-	851	%59	Metilasyon Spesifik PZR
Wong ve ark. 2010	255	%10	52	%23,07	Methylight ve MS-HRM
İwamoto ve ark. 2010	200	%21,5	162	%19,1	Metilasyon Spesifik PZR
Wojdacz ve ark. 2011	75	%4	75	%23	MS-HRM
Çalışmamız	30	%16,7	30	%60	MS-HRM

Not: MS-HRM (Metilasyon Sensitive High Resolution Melting)

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda otuz meme kanserli BRCA1 mutasyonu taşımayan olgudan alınan periferik kan ve doku örneklerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra hedef DNA'lar sodyum bisülfid ile inkübasyona sokularak metile sitozinlerin bisülfid dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu olgularda BRCA1 geni promotor bölgesi metilasyon durumunu saptayabilmek için MS-HRM yöntemi ile metilasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma MS-HRM yöntemi ile meme kanserinde aşırı metilasyonu gözlenen bu genin tümör ve periferik kan dokularında metilasyon seviyesini saptayabilmek ve meme kanserinin tedavisinde kullanılan bazı prognostik faktörleri karşılaştırabilmek için yapılmıştır.

Çalışmamız sonucunda tümörlü dokularda BRCA1 promotor aşırı metilasyonu diğer literatürdeki çalışmalardan önemli oranda yüksek seviyede bulunmuştur. Ayrıca diğer birçok çalışmadan farklı olarak meme kanserinde bu genlerin metilasyon yüzdeleri ve diğer yöntemlerin saptayamadığı düşük metilasyon seviyeleri de saptanabilmiştir. Çalışmamızda kullanılan MS-HRM yönteminin hassasiyetinin yüksek olmasının, karşılaştırılan literatüre göre oransal farklılık yarattığı sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda, diğer çalışmaları destekleyecek şekilde sporadik meme kanserlerinde BRCA1 inaktivasyonunda metilasyonun önemli bir rol üstlendiği gösterilmiştir. Ancak bu çalışmanın devamı niteliğinde ekspresyon çalışmalarının yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

Genel olarak kanserin epigenetik özellikleri arasında metilasyonun, erken evrede başlayan bir süreç olduğu görüşü hakimdir. Çalışmamızda derece I tümörlerde anormal metilasyonun gözlenmiş olması bu görüşü destekler niteliktedir.

Meme kanseri olgularının periferik kanında metilasyon analizlerinin yapılabilirliği bu çalışma ile desteklenmiştir. Periferik kanda saptanan anormal metilasyon paterninin

sirkülasyondaki tümör hücrelerinden mi kaynaklandığı, somatik olarak bu dokuda da gözlenen bir süreç mi olduğu hala tartışma konusudur. İleri analizler ile periferik kan ile yapılacak geniş hasta tabanlı çalışmalarla, bu konu hakkında daha kesin yorumlar yapılabileceği görüşünderiz.

Prognostik faktörler ve yaş ile istatistiksel anlam kurulamamasının sebebi olarak olgu sayımızın azlığı gösterilebilir. Olgu sayısı artırılarak prognostik faktörler ve yaş ile metilasyon durumu hakkında daha sağlıklı karşılaştırma yapılabilir. Çalışmamızdan elde edilen verilerin, daha da anlam kazanabilmesi için hasta sayısının artırılması, hastaların sağ kalımları, menopozal durumları ve hastalığın prognozu gibi verilerin de eklenmesiyle çalışmanın genişletilmesi gerekmektedir. Çalışmamız ve belirttiğimiz yönde yapılacak çalışmalar, ülkemizde meme kanserlerinin tedavisi amacıyla yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine ve bu protokollerin klinikte kullanımlarına ışık tutacaktır.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Andersen, T.I., 1996, Genetic heterogeneity in breast cancer susceptibility, *Acta Oncology*, 35, 407-410 p.
2. Antoniou, A., Pharoah, P.D., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., 2003, Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A Combined Analysis of 22 Studies, *American Journal of Human Genetics*, 1117-1130 p.
3. Bane, A.L., Tjan, S., Parkes, R.K., Andrulis, I., O'Malley, F.P., 2005, Invasive lobular carcinoma: to grade or not to grade. *Mod Pathology*, 18: 621-8 p.
4. Baylin, S.B., 2005, DNA methylation and gene silencing in cancer, *Nature Clinical Practise Oncology*, 1, 4-11 p.
5. Bianco, T., Chenevix-Trench, G., Walsh, D.C.A., Cooper, J.E., Dobrovic, A., 2000, Tumor-specific distribution of BRCA1 promotor region methylation supports a pathogenetic role in breast and ovarian cancer, *Carcinogenesis*, vol.21 no.2, 147-151 p.
6. Birgisdottir, V., Stefansson, O. A., Bodvarsdottir, S.K., Hilmarsdottir, H., Jonasson, J. G., Eyfjord, J. E., 2006, Epigenetic silencing and deletion of the *BRCA1* gene in sporadic breast cancer, <http://breast-cancerresearch.com/content/8/4/R38>
7. Borg, A., Isola, J., Chen, J., Rubio, C., Johansson, U., Werelius, B., 2000, Germline BRCA1 and HMLH1 mutations in a family with male and female breast carcinoma, *Int J Cancer*, 796-800 p.
8. Boyle P., Ferlay J.: Cancer incidence and mortality in Europe, 2005, *Annals of Oncology* 16:481-8 p.
9. Catteau, A., Morris, J. R., 2002, *BRCA1* methylation: a significant role in tumour development?, *Cancer Biology*, Vol. 12, 359–371p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

10. Catteau, A., Harris, W. H., Xu, C. F., Solomon, E., 1999, Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer; correlation with disease characteristics, *Oncogene* 18, 1957-1965 p.
11. Chung, C., Leung, Y. L., Glover, J. N. M., 2011, BRCT domains, Easy as one , two, three, *Cell Cycle* 10: Landes Bioscience, 2461-2470 p.
12. Cotran, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L., 1992, Biology of Tumor Growth, Neoplasia In: Frederick J Schoen, Robbin's Pathology 5th ed. W.B. Saunders, Chapter 7, 293-296 p.
13. Demirelli, F.H., 2003, Kanserin moleküler genetik temelleri, *Güncel Klinik Onkoloji Sempozyum Dizisi*, 37, 9-15 s.
14. Di Cosimo, S., Baselga, J., 2008, Targeted therapies in breast cancer: where are we now?, *European Journal of Cancer*. 44(18):2781-90 p.
15. Dobovric, A., Simpfendorfer, D., 1997, Methylation of the *BRCA1* gene in sporadic breast cancer, *Cancer Research*, 57:3347-3350 p.
16. Doğan, A. L., Güç, D., 2004, Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser, *Hacettepe Tıp Dergisi*; 35:34-42 s.
17. Doğu, G.G., Çıtlı, R., Dikilitaş, M., Özkan, M., Er, Ö., Öztürk, A., Altınbaş, M., 2007, Kemoterapi alan hastaların sosyodemografik ve tanısal özellikleri, *Erciyes Tıp Dergisi* 29(2), 132-138 s.
18. Duncan, J.A., Reeves, J.R., Cooke, T.G., 1998, BRCA1 and BRCA2 proteins: roles in health and disease, *Mol Pathol* 1998; 51 (5): 237-247 p.
19. Ekmekçi, A., Erbas, D., 1991, Kanserin moleküler mekanizması, *Onkogenler ve Büyüme Faktörleri*, Ankara.
20. Ellis, I.O., Pinder, S.E., Lee, A.H.S., Elston, C.W., 2000, Tumors of the breast. In: *Diagnostic Histopathology of Tumors*, Fletcher C D M (ed). Second Edition. London: Churvhill Livigstone, 865-930 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

21. Esteller, M., 2008, Epigenetics in cancer, N. Engl. J. Med, 358: 1148–1159 p.
22. Francis, G., Beadlet, G., Thomas, S., Mengersen, K., 2006, Evaluation of estrogen and progesterone receptor status in HER-2 positive breast carcinomas and correlation with outcome, Pathology, 38, 391-398 p.
23. Gardner, L., Lee, L., Dang, C., July 2002, Adapted from MYC oncogene, Encyclopedia of cancer (online Access), second edition, 1-13p.
24. Geoffey, M.C., Hausman, E. R., 2006, Hücre: Moleküler Yaklaşım, Çeviren: Sakızlı M., Atabey N.), İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 592-640s.
25. Greenberg, R. A., 2011, BRCA1, Everything but the RING?, Science, Vol. 334 no. 6055, 459-460 p.,
26. Gronbaek, K., Hother, C., Jones, P.A., 2007, Epigenetic changes in cancer, APMIS;115: 1039-59 p.
27. Haydaroğlu, A., Dubova, S, Özarsan, Z., Bölükbaşı, Y., Yılmaz, R., Kapkaç, M., Özdedeli, E., 2005, Ege Üniversitesinde Meme Kanseri: 3897 Olgunun Değerlendirilmesi, Meme Sağlığı Dergisi Cilt:1 Sayı:1
28. Huang, Y., Nayak, S., Jankowitz, R., Davidson, N.E., Oesterreich, S., 2011, Epigenetics in breast cancer: what's new?, Breast Cancer Research, 13:225 p.
29. Iau, P.T., Macmillan, R.D., Blamey, R.W., 2001, Germ line mutations associated with breast cancer susceptibility, Eur J Cancer, 37 (3): 300-321p.
30. Isaacs, C., Rebbeck, T.,R., 2007, Hereditary Breast Cancer.Informa Health Care, 146-147 p.
31. Ivshina, A.V., George, J., Senko, O., Mow, B., Putti, T.C., Smeds, J., ve ark. Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer, 2006, American Association for Cancer Research, 66: 10292-301 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

32. Iwamoto, T., Yamamoto, N., Taguchi, T., Tamaki, Y., Shinzaburo, N., 2010, BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation, Breast Cancer Res Treat DOI 10.1007/s10549-010-1188-1
33. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011, Global Cancer Statistics, A Cancer Journal for Clinicians; 69–90 p.
34. Jenuwein, T., Allis, 2001, “Translating the histone code”, Science, 293, 1074–1080 p.
35. Khan, S.A., Rogers, M.A., Khurana, K.K., Meguid, M.M., Numann, P.J., 1998, Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk, J Natl Cancer Inst., 37-42 p.
36. Kırıçoğlu, C.E., Öztürk, C., Köktürk, N., 2003, Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde epidermal büyüme faktör reseptörü ve inhibitörlerinin yeri, Solunum, 5:146-152 s.
37. Kristensen, L.S., Nielsen, H.M., Hansen, L.L., 2009, Epigenetics and cancer treatment. Eur J Pharmacol, 625: 131-42 p.
38. Lixia, M., Zhijian, C., Chao, S., Chaojiang ,G., Congyi, Z., 2007, Alternative splicing of breast cancer associated gene BRCA1 from Breast Cancer Cell Line , Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 40, No.1, 15- 21 p.
39. Mancini, D. N., Rodenhiser, D. I., Ainsworth, P.J., O’Malley, F.P., Singh, S. M., Xing, W., Archer, T. K., 1998, CpG methylation within the 5’ regulatory region of the *BRCA1* gene is tumor specific and includes a putative CREB binding site. Oncogene 16:1161– 1169 p.
40. Matros, E., Wang, Z. C., Lodeiro, G., Miron, A., Iglehart, J. D., Richardson, A. L., 2005, BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles, Breast Cancer Research and Treatment, 91: 179–186 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

41. McCoy, M. L., Mueller, C. R., Roskelley, C. D., 2003, The role of the breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) in sporadic epithelial ovarian cancer, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1:72 p.
42. Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P.A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L.M., Ding W., Bell R., Rosenthal J., Hussey C., Than T., McClure M., Frye C., Hattier T., Phelps R., Haugen-Strano A., Katcher H., Yakumo K., Gholami Z., Shaffer D., Stone S., Bayer S., Wray C., Bogden R., Dayananth P., Ward J., Tonin P., 1994, A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1, *Science*, 266:66-71 p.
43. Mueller, C.R., Roskelley, C. D., 2003, Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer, *Breast Cancer Research* , 5:45-52 p.
44. Murell, A., Rakyen K.V., Beck, S., 2005, From genome to epigenome, *Human Molecular Genetics*, 14 p.
45. Nakopoulou, L., Gakiopoulou-Givalou, H., Karayiannakis, A.J., Giannopoulou, I., Osborne, C., Wilson, P., Tripathy, D., 2004, Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications, *Oncologist*, 9, 361-77 p.
46. Niwa, Y., Oyama, T., Nakajima, T., 2000, BRCA1 expression status in relation to DNA methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast cancers, *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 519–526 p.
47. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., 2005, Thompson&Thompson, *Tıbbi Genetik, Güneş Kitabevi*, 311-332s.
48. Özgültekin, R., 2001, Meme kanserinde etiyoloji ve risk faktörleri, *Meme Hastalıkları, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri*; 233-45s.
49. Park, S.Y., Kim, B.H., Kim, J.H., Cho, N.Y., Choi, M., Yu, E.J., 2007, Methylation profiles of CpG island loci in major types of human cancers, *Journal of Korean Medical Science*, 22, 311-7 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

50. Payne, S.J., Bowen, R.L., Jones, J.L., Wells, C.A., 2008, Predictive markers in breast cancer-the present, *Histopathology*, 82-90 p.
51. Peter, T., Sian, E., 2005, *Emery's Elements of Medical Genetics*, Twelfth Edition, p.
52. Rakha, E.A., El-Sayed, M.E., Lee, A. H., Elston, C. W., Grainge, M. J., Hodi, Z., Blamey R. W., Ellis, I. O., 2008, Prognostic significance of nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma, *Journal of Clinical Oncology*, 3153-3158 p.
53. Rebeck, T., Couch J., Kant, J., Calzone, K., Deshano, M., Peng, Y., Chen, K., Garber, J., Weber, B., 1996, Genetic Heterogeneity in hereditary breast cancer: Role of BRCA1 and BRCA2, *American Journal of Human Genetics* 59, 547-553 p.
54. Rice, J.C., Ozçelik, H., Maxeiner, P., Andrulis, I., Futscher, B.W., 2000, Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens, *Carcinogenesis* vol.21 no.9, 1761-1765 p.
55. Rice J.C., Massey-Brown, K.S., Futscher, B.W., 1998, Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene* 17:1807–1812 p.
56. Robertson, K.D., 2001, DNA methylation, methyltransferases and cancer, *Oncogene*, 20, 3139-55 p.
57. Sankaran, S., Starita, L.M., Simons, A.M., Parvin, J.D., 2006, Identification of domains of BRCA1 critical for ubiquitin-dependent inhibition of centrosome function, *Cancer Research*, 4100-4107 p.
58. Sayın, D.B., 2008, Metilasyon ve Kanser, *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 28, 513-524 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

59. Snell, C., Krypuy, M., Wong, E.M., Loughrey, M. B., Dobrovic, A., 2008, *BRCA1* promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a *BRCA1* tumour phenotype, <http://breast-cancer-research.com/content/10/1/R12>
60. Sommer, S., Fuqua, S.A., 2001, Estrogen receptor and breast cancer, *Cancer Biology*. 11(5):339-352 p.
61. Strachan, Tom., Read, Andrew P., 1999, *Human Molecular Genetics 2*, Garland Science
62. Suen, T. C., Goss, P. E., 1999, Transcription of *BRCA1* is dependent on the formation of a specific protein-DNA complex on the minimal *BRCA1* Bi-directional promoter, *J Biol Chem*, 274:31297-31304 p.
63. Szyf, M., Pakneshan, P., Rabbani, S.A., 2004, DNA Methylation and Breast Cancer, *Biochemical Pharmacological Sciences*, 22(7):350-354 p.
64. Tavassoli, F.A., 1999, *Pathology of the breast*, 2nd ed. Stamford: Appleton-Lange, pp. 481-570 p.
65. Terry, M. B., Delgado-Cruzata, L., Vin-Raviv, N., Wu, H. C., Santella R. M., 2011, DNA methylation in white blood cells Association with risk factors in epidemiologic studies, *Epigenetics Landes Bioscience*, 6:7, 828-837 p.
66. Topuz, E., 1997, *Meme Kanseri, Biyoloji, Tanı, Evreleme, Tedavi*, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 3, İstanbul.
67. Tuncel, T., 2010, *Meme kanserli olgularda BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki duplikasyon ve delesyonların MLPA tekniği ile incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, ESOGÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 78 s.
68. Ünal, G., Ünal, H., 2001, *Meme Hastalıkları*, Nobel Tıp Kitabevleri, 42, 310-313 s.
69. Venkitaraman, A.R., 2001, Functions of *BRCA1* and *BRCA2* in the biological response to DNA damage, *J Cell Sci*, 114: 3591-3598 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

70. Warnecke, P.M., Bestor, T.H., 2000, Cytosine methylation and human cancer, *Current Opinion in Oncology*, 12, 68- 73 p.
71. William, S.K., Cummings, MR., *Genetik Kavramlar*, 2000, (Çev.: Öner C.),Palme Yayıncılık, Ankara, 635-636 p.
72. Wojdacz, T.K., Dobrovic, A., 2007, Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation, *Nucleic Acids Research*, 2007, Vol. 35, No. 6
73. Wojdacz, T.K., Thestrup, B. B., Overgaard, J., Hansen, L. L., 2011, Methylation of cancer related genes in tumor and peripheral blood DNA from the same breast cancer patient as two independent events, *Diagnostic Pathology*, 6:11p.
74. Wong, E.M., Dobrovic, A., 2011, Chapter 14 Assessing Gene-Specific Methylation Using HRM-Based Analysis, *Methods Mol Biol.*, 687:207-217 p.
75. Wong, E. M., Southey, M. C., Fox, S. B., Brown, M. A., Dowty, J. G., Jenkins, M. A., Giles, G. G., Hopper, J. L., Dobrovic A., 2010, Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer, *American Association for Cancer Research*, DOI:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0212
76. Wooster, R., Weber, B.L., 2003, Breast and ovarian cancer, *N Engl J Med*; 348 (23): 2339-2347 p.
77. Wu, J., Lu, L., Yu, X., 2010, The role Of BRCA1 in Damage Response, *Protein Cell*, 1(2): 117–123 p.
78. Xu, C.F., Brown, M.A., Chambers, J.A., Griffiths, B., Nicolai, H., Solomon, E., 1995, Distinct transcription start sites generate two forms of BRCA1 mRNA. *Human Molecular Genetics*, 4:2259-2264 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

79. Xu, X., Gammon, M. D., Zhang, Y., Bestor, T. H., Zeisel, S. H., Wetmur, J. G., Wallenstein, S., Bradshaw, P. T., Garbowski, G., Teitelbaum, S. L., Neugut, A. I., Santella, R. M., Chen, J., 2010, BRCA1 promoter methylation is associated with increased mortality among women with breast cancer, *Breast Cancer Research Treat*, 115:397–404 p.
80. Yi, W., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J., Qin, J., 2000, BASC, A Super Complex of BRCA1-Associated Proteins involved in the Recognition and Repair Of Aberrant DNA Structures, *Genes&Development*, 14:927-936 p.
81. Yoshida, K., Miki, Y., 2004, Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage, *Cancer Science*. 95(11): 866-871 p.
82. Zheng, L., Li, S., Boyer, T., Lee, W., 2000, Lessons learned from BRCA1 and BRCA2 , *Oncogene* , 6159-6175p.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Ad Soyad: Yasemin CANNAZİK

Doğum Tarihi ve Yeri: 28.01.1987-Ağrı

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi: Yenibağlar Mah. Eker Sok. No:11/10 ESKİŞEHİR

ycannazik@gmail.com

0530 603 68 88

Eğitim Durumu: 2009-2012 ESOĞÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik
A.B.D. ESKİŞEHİR

Yüksek Lisans

2005-2009 ESOĞÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü-
ESKİŞEHİR

Lisans

2001-2005 Manisa Lisesi (Y.D.A.)-MANİSA

Lise

1993-2001 Murat Germen İlköğretim Okulu- MANİSA

İlköğretim